



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 673**

51 Int. Cl.:  
**A61P 37/06** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A01K 67/027** (2006.01)  
**C07K 16/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03781490 .2**  
96 Fecha de presentación : **29.10.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1576011**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2005**

54 Título: **Inhibición de la producción de IL-17.**

30 Prioridad: **30.10.2002 US 423090 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.11.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.11.2009**

73 Titular/es: **Genentech, Inc.**  
**1 DNA Way**  
**South San Francisco, California 94080-4990, US**

72 Inventor/es: **Gurney, Austin, L.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 329 673 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

Inhibición de la producción de IL-17.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a la inhibición de la producción de la citoquina proinflamatoria interleuquina-17 (IL-17) por los linfocitos T, usando un antagonista de interleuquina-23 (IL-23). La invención se refiere además al uso de antagonistas de IL-23 en el tratamiento de enfermedades inflamatorias caracterizadas por la presencia de niveles elevados de IL-17.

**Descripción de la técnica relacionada**

15 La IL-17 es una molécula proinflamatoria derivada de linfocitos T que estimula las células epiteliales, endoteliales y fibroblásticas para producir otras citoquinas y quimioquinas inflamatorias incluyendo IL-6, IL-8, G-CSF y MCP-1 (S. Aggarwal, A.L. Gurney, *J. Leukoc. Biol.* 71, 1 (2002); Z. Yao y col., *Immunity* 3, 811 (1995); J. Kennedy y col., *J. Interferon Cytokine Res.* 16, 611 (1996); F. Fossiez y col., *J. Exp. Med.* 183, 2593 (1996); A. Linden, H. Hoshino, M. Laan, *Eur. Respir. J.* 15, 973 (2000); X.Y. Cai, C.P. Gommoll, Jr., L. Justice, S.K. Narula, J.S. Fine, *Immunol. Lett.* 62, 51 (1998); D.V. Jovanovic y col., *J. Immunol.* 160, 3513 (1998); y M. Laan y col., *J. Immunol.* 162, 2347 (1999)).

25 La IL-17 tiene efecto sinérgico con otras citoquinas incluyendo el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  para inducir más la expresión de quimioquinas (Jovanovic y col., véase antes, y M. Chabaud, F. Fossiez, J.L. Taupin, P. Miossec, *J. Immunol.* 161, 409 (1998)). Se encuentra que los niveles de IL-17 son significativamente elevados en la sinovia en la artritis reumatoide (AR) (S. Kotake y col., *J. Clin. Invest.* 103, 1345 (1999); y M. Chabaud y col., *Arthritis Rheum.* 42, 963 (1999)), durante el rechazo de aloinjerto (M.A. Antonysamy y col., *Transplant Proc.* 31 (1999); M.A. Antonysamy y col., *J. Immunol.* 162, 577 (1999); C.C. Loong, C.Y. Lin, W.Y. Lui, *Transplant Proc.* 32 (2000); y H.G. Hsieh, C.C. Loong, W.Y. Lui, A. Chen, C.Y. Lin, *Transpl. Int.* 14, 287 (2001)), y en otras enfermedades inflamatorias crónicas incluyendo la esclerosis múltiple (K. Kurasawa y col., *Arthritis Rheum.* 43, 2455 (2000)) y la psoriasis (C. Albanesi y col., *J. Invest. Dermatol.* 115, 81 (2000), y B. Homey y col., *J. Immunol.* 164, 6621 (2000)). Aunque es producida claramente por linfocitos T activados, las publicaciones previas no han proporcionado una clasificación clara de la IL-17 dentro del paradigma de los perfiles de citoquinas polarizadas Th1 y Th2.

35 La IL-23 es una citoquina heterodímera, que comparte una subunidad, denominada p40, con la interleuquina-12 (IL-12), que combina con una subunidad única, p19 (B. Oppmann y col., *Immunity* 13, 715(2000)). Se ha publicado que la IL-23 promueve la proliferación de linfocitos T, en particular linfocitos T de memoria (D.M. Frucht, *Sci. STKE* 2002 Jan. 5; 2002(114):PE1). Recientemente se ha descrito que ratones transgénicos en p19 presentan inflamación sistémica profunda y neutrofilia (M. T. Wiekowski y col., *J. Immunol.* 166, 7563(2001)).

40 Hasta ahora no se ha establecido una correlación entre la expresión y las funciones biológicas de las citoquinas IL-17 e IL-23.

45 Benson y col., *FASEB* 16(5), 2002 describen el uso de un anticuerpo anti-IL-12p40 para tratar la encefalomiелitis autoinmune experimental.

**Resumen de la invención**

50 La invención proporciona el uso y la composición para usar como se define en las reivindicaciones.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un procedimiento para identificar un agente antiinflamatorio que comprende las etapas de:

- 55 (a) incubar un cultivo de linfocitos T con IL-23, en presencia y ausencia de una molécula candidato;
- (b) hacer el seguimiento del nivel de IL-17 en el cultivo; y
- (c) identificar la molécula candidato como un agente antiinflamatorio si el nivel de IL-17 es menor en presencia que en ausencia de dicha molécula candidato.
- 60

En todos los aspectos, el antagonista es un anticuerpo anti-IL-23 o anti-receptor de IL-23, incluyendo fragmentos de anticuerpo. La enfermedad inflamatoria preferiblemente es una afección inflamatoria crónica, tal como, por ejemplo artritis reumatoide (AR), reacción de injerto contra huésped que puede conducir al rechazo de aloinjerto, esclerosis múltiple (EM) o psoriasis.

65

**Breve descripción de las figuras**

Figura 1. Producción de IL-17 en diferentes tipos de células (A): Se prepararon suspensiones unicelulares de bazo a partir de ratones C57/BL-6 y las células mononucleares se aislaron de esplenocitos suspendidos por centrifugación en gradiente de densidad. Se cultivaron  $2 \times 10^6$  células/ml en presencia o ausencia de lipopéptido microbiano LBP (100 ng/ml), LPS (100 ng/ml) o LTA (100 ng/ml) durante 3 días, después de los cuales se recogieron las células y se analizó la IL-17 usando ELISA. (B): Los linfocitos T purificados se obtuvieron de esplenocitos murinos después de selección positiva de células marcadas con CD90 separadas por FACS. Estas células se cultivaron ( $1 \times 10^6$  células/ml) en presencia o ausencia de anti-CD3 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) unido a la placa, o líquido sobrenadante de células dendríticas activadas (tratadas con LPS) durante 3 días, y los líquidos sobrenadantes de los cultivos se recogieron y se analizaron los niveles de IL-17 usando un kit ELISA. Las células dendríticas se obtuvieron de macrófagos (obtenidos como población adherente de suspensión de esplenocitos), por tratamiento de los macrófagos con rmGM-CSF (2 ng/ml) y rmIL-4 (1000 U/ml) durante 4 días, lavado y reactivación usando LPS ( $0,5 \mu\text{g/ml}$ ). Se muestran los resultados representativos de 3 experimentos independientes.

Figura 2. *La IL-23 estimula la producción de IL-17.* A. Las células mononucleares aisladas de esplenocitos se cultivaron ( $2 \times 10^6$  células/ml) con 100 U/ml de IL-2 recombinante y se incubaron en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de IL-23 (0,1-1000 ng/ml) durante 6 días. Se midieron los niveles de IL-17 acumulada en los líquidos sobrenadantes de los cultivos usando ELISA. B. Se midieron los cambios en los niveles de ARNm para la IL-17 en respuesta al tratamiento con IL-23, por RT-PCR cuantitativa. Se representa gráficamente el cambio relativo de Ct (umbral del ciclo) de la reacción de PCR. Los datos de cada muestra se normalizan respecto al nivel de ARNm de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa presente en cada muestra y después se vuelven a normalizar entre muestras al nivel de ARNm de IL-17 presente en el tiempo cero en condiciones no estimuladas. Puesto que cada Ct corresponde a un ciclo de la PCR, un Ct es aproximadamente igual a un cambio de 2 veces de la abundancia de ARNm. Entre paréntesis se indica el número de veces aproximado de diferencia de ARNm, para cambios de 5 Ct y 10 Ct. El experimento se llevó a cabo con esplenocitos de 4 ratones, y los datos puntuales individuales se representan con x y el cambio medio de Ct se indica por las columnas de barras. C. Se midieron los cambios de los niveles de ARNm del miembro IL-17F de la familia de IL-17 en respuesta al tratamiento con IL-23 por RT-PCR cuantitativo, como en la leyenda de la fig. 2B.

Figura 3. *La IL-23 actúa en los linfocitos T de memoria para inducir la producción de IL-17.* Se tiñeron células mononucleares aisladas de una suspensión unicelular de esplenocitos murinos con (a) CyC-CD4 + PE-CD44 o (b) CyC-CD4 + PE-CD62L y se separaron las células CD4<sup>+</sup> que eran CD44<sup>alto</sup>/CD62L<sup>bajo</sup> para el fenotipo de memoria o CD44<sup>bajo</sup>/CD62L<sup>alto</sup> para el fenotipo indiferenciado. Las células separadas se cultivaron con 100 U/ml de IL-2 recombinante en presencia o ausencia de IL-23 (o su preparación hervida como control), anti-CD3 unido a la placa ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) y anti-CD28 ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), durante 5 días, se lavaron y se volvieron a estimular con anticuerpo anti-CD3 durante otras 24 horas. Se recogieron los líquidos sobrenadantes y se midieron los niveles de IL-17 usando ELISA.

Figura 4: *El anticuerpo de IL12p40 bloquea la producción de IL-17 dependiente de IL-23:* (A) Se preincubaron concentraciones crecientes de anticuerpo de p40 o un anticuerpo de control de isotipo coincidente no relacionado, con IL-23 (100 ng/ml) durante 1 h, a 37°C y después se incubaron durante otros 5-6 días con células mononucleares aisladas de bazo de ratón ( $2 \times 10^6$  células/ml) en presencia de IL-2 recombinante. Se recogió el líquido sobrenadante y se midieron los niveles de IL-17 usando ELISA (panel izquierdo). Se preincubaron concentraciones óptimas de anticuerpo de IL12p40 o un anticuerpo de control de isotipo coincidente no relacionado con medio condicionado de células dendríticas estimuladas con LPS (al 10% v/v) durante 1 h a 37°C, y después se incubaron durante otros 5 días con células mononucleares aisladas de bazo de ratón ( $2 \times 10^6$  células/ml) en presencia de IL-2 recombinante. Se recogió el líquido sobrenadante y se midieron los niveles de IL-17 usando ELISA (panel derecho). (B) Se cultivaron células mononucleares aisladas de esplenocitos de ratones salvajes (C57/BL6) o ratones que carecían de uno de los componentes de la IL-12, es decir, 4 IL12a<sup>-/-</sup> (no expresan p35) o IL12b<sup>-/-</sup> (no expresan p40) en presencia de ConA durante 3 días y se midieron los niveles de IL-17 en los líquidos sobrenadantes usando ELISA.

Figura 5: *Efecto de la IL-12 en la producción de IL-17.* (A) Células mononucleares aisladas de cultivos de células de bazo se incubaron en presencia de IL-23 purificada (1 nM) y la concentración indicada de IL-12 durante 5 días y después se lavaron y reestimularon con ConA durante otras 24 horas. Se midieron los niveles de IL-17 en el líquido sobrenadante celular usando kits para ELISA. (B): Se incubaron células mononucleares aisladas de cultivos de células de bazo de ratones salvajes o que carecían de IL-12Rβ2 (IL-12Rβ2<sup>-/-</sup> ko) en presencia o ausencia de IL-23 purificada (1 nM) durante 5 días, y después se lavaron y se reestimularon con ConA durante otras 24 horas. Se midieron los niveles de IL-17 e IFN-γ en el líquido sobrenadante celular usando kits para ELISA.

Figura 6: *Localización del locus de IL-23p19.* A: Se representan a escala mediante barras oblicuas dobles el locus de IL-23p19 nativo (superior), la construcción de localización (medio), y el locus correctamente localizado (inferior), salvo que se indique lo contrario. Las cajas blancas indican exones codificantes y las cajas rayadas representan exones que codifican las regiones no traducidas 5' y 3' del ARN mensajero (ARNm) resultante. Los 4 exones codificantes del gen p19 están numerados. Las cajas con flechas indican las regiones promotoras para la neomicina (neo) y los casetes de selección de la timidina quinasa (tk), y una caja blanca marcada EGPF indica la situación de un gen indicador de la proteína verde fluorescente potenciada. Los sitios de restricción usados para la clonación y el análisis de los brazos están designados como sigue: B, Bam HI; S, Sac II; E, Eco RI; Bg, Bgl II; X, Xho I. La posición del cebador antisentido usado para amplificar el brazo corto, está indicado con la letra P y una flecha. El tamaño de los fragmentos

de restricción que resultan de la digestión de Bam HI y Eco RI están indicados en el locus salvaje (SAL) y mutado (MUT), y las posiciones de las 2 sondas usadas para detectar estos fragmentos por transferencia Southern se muestran con líneas gruesas. B y C: análisis de transferencia Southern de las digestiones con Bam HI hibridadas con la sonda I, y digestiones con Eco RI hibridadas con la sonda II, respectivamente. Se extrajo el ADN de las células madre embrionarias (ES) salvajes, del clon de ES 1c5, y de un ratón salvaje, un heterocigoto (HET) y uno genomanipulado (KO, *por sus siglas en inglés knock-out*). La identificación de la banda se indica en el lado izquierdo de la transferencia, mientras que su tamaño se da en el lado derecho.

Figura 7: Niveles de inmunoglobulina total en el suero de ratones IL-23p19<sup>-/-</sup>. Los niveles en el suero de isotipos de inmunoglobulina se determinaron por ELISA específico de isotipo de grupos de 16 ratones salvajes (círculos negros) y de IL-23p19<sup>-/-</sup> (círculos blancos). Los isotipos de inmunoglobulina están indicados en la parte inferior de la gráfica.

Figura 8: Respuesta inmunitaria humoral en ratones IL-23p19<sup>-/-</sup> A-G: Niveles específicos para ovalbúmina (OVA) de IgG1 (A), IgG2a (B), IgG2b (C), IgG3 (D), IgE (E) y IgA (F) después de una (1<sup>a</sup>) y dos (2<sup>a</sup>) inmunizaciones con OVA. Círculos negros, ratones salvajes; círculos blancos, ratones IL-23p19<sup>-/-</sup>; círculos grises, ratones IL-12p40<sup>-/-</sup>. Las unidades arbitrarias se calcularon como se describe en procedimientos y materiales. La media de cada grupo se indica tanto con una barra negra horizontal como con un valor numérico en la parte inferior de la gráfica. Los asteriscos marcan valores P estadísticamente significativos menores de 0,05.

Figura 9: Las respuestas de linfocitos B independientes de T son normales en ratones IL-23p19<sup>-/-</sup>. Los niveles en el suero de IgM específica de TNP se determinaron por ELISA en ratones inmunizados con TNP-LPS (tipo I, izquierda) o TNP-Ficoll (tipo II, derecha). Círculos negros, ratones salvajes; círculos blancos, ratones IL-23p19<sup>-/-</sup>.

Figura 10: Función de los linfocitos T de memoria. Se inmunizaron ratones salvajes (círculos negros) y IL-23p19<sup>-/-</sup> (círculos blancos) el día 0 con Ovalbúmina y se estimularon el día 21 con TNP-OVA. Se recogió el suero los días 0, 14 y 26 y se ensayó por ELISA la presencia de IgG1(A) e IgG2a (B) específicos de TNP. Para la IgG1 se usó un patrón disponible en el comercio. Para la IgG2a, se calcularon unidades arbitrarias como se describe en procedimientos y materiales.

Figura 11: Reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (HTR). El hinchamiento específico inducido por antígeno se calcula como un porcentaje de aumento del grosor de la pata frente al valor justo antes de la estimulación. Los resultados son la media de los 6 ratones en cada grupo, las barras de error representan las desviaciones típicas. Se usa un segundo grupo salvaje que no se había sensibilizado, como un control para el hinchamiento inducido por antígeno solo. Un asterisco dentro de un símbolo indica que la diferencia entre el grupo correspondiente y los ratones salvajes es estadísticamente significativa (P<0,05). WT, salvaje, p19ko, ratones IL-23p19<sup>-/-</sup>; p40ko, ratones IL-12p40<sup>-/-</sup>.

Figura 12: La sensibilización de linfocitos T normales reduce los niveles de producción de IL-17 por las células presentadoras de antígeno IL-23p19<sup>-/-</sup>. A: experimento de aloestimulación *in vitro* de linfocitos T de balb/c combinado con células dendríticas salvajes (barras negras) o IL-23p19<sup>-/-</sup> (barras blancas). Se aislaron linfocitos T CD4<sup>+</sup> indiferenciados y CD8<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup>/MHC-II<sup>+</sup> por FACS, y se incubaron en presencia o ausencia de lipopéptidos bacterianos (BLP). La proliferación y los niveles de citoquinas en los líquidos sobrenadantes se determinaron después de un periodo de 5 días de incubación. Células presentadoras de antígeno, APC. B: respuesta de linfocitos T *in vivo*. Se aislaron suspensiones de células de nódulos linfáticos de ratones salvajes (barras negras) o IL-23p19<sup>-/-</sup> (barras blancas) inmunizados con KLH y se reestimularon *in vitro* con KLH 25 µg/ml. La proliferación y los niveles de IL-17 se midieron después de 5 días en cultivo.

## Descripción detallada de la realización preferida

### A. Definiciones

Salvo que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un 5 experto en la técnica a la que pertenece la invención. Véase, p. ej., Singleton y col., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed.*, J. Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrook y co., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989). Para los propósitos de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos.

El término “antagonista” se usa en el presente documento en el sentido más amplio. Un “antagonista” de IL-23 es una molécula, que bloquea, inhibe, neutraliza, previene o interfiere parcial o totalmente la actividad biológica de la IL-23, independientemente del mecanismo subyacente. Para los propósitos de la presente invención, la actividad biológica preferiblemente es la capacidad para inducir la producción de IL-17 en linfocitos T activados. Los antagonistas de la IL-23 se pueden identificar, por ejemplo, basándose en su capacidad para inhibir, bloquear o invertir la producción de IL-17 mediada por IL-23 en poblaciones de linfocitos T activados (p. ej., de memoria). Por ejemplo, se puede incubar un cultivo de linfocitos T activados con IL-23, en presencia y ausencia de un compuesto de ensayo, y hacer el seguimiento del nivel de IL-17 en el líquido sobrenadante del cultivo celular, p. ej., por ELISA. Si el nivel de IL-17 es menor en presencia del compuesto de ensayo que en su ausencia, el compuesto de ensayo es un antagonista de la IL-23. Alternativamente, se puede usar una RT-PCR en tiempo real para hacer el seguimiento de la expresión del ARN de IL-17 en un tejido que expresa también IL-23, antes 3 y después de tratamiento con un compuesto de ensayo. La disminución del nivel de ARNm de IL-17 en presencia del compuesto de ensayo indica que el compuesto

es un antagonista de IL-23. Los ejemplos de antagonistas de IL-23 incluyen, sin limitación, anticuerpos neutralizantes contra una subunidad, p. ej., una subunidad p40, de una secuencia nativa del polipéptido de IL-23, inmunoadhesinas que comprenden una subunidad de IL-23 fusionada a una secuencia de la región constante de la inmunoglobulina, moléculas pequeñas, oligonucleótidos antisentido capaces de inhibir la traducción y/o transcripción de un gen que codifica una subunidad de una secuencia nativa del polipéptido IL-23, señuelos, p. ej. señuelos genéticos del gen de la IL-23, etc. Igualmente los antagonistas de IL-23 incluyen, sin limitación, anticuerpos neutralizantes i contra una subunidad, p. ej., una subunidad IL-12R $\beta$ 1 o IL23R de un receptor de IL-23 nativo, inmunoadhesinas que comprenden una subunidad del receptor de IL-23 fusionado a una secuencia de la región constante de la inmunoglobulina, moléculas pequeñas, oligonucleótidos antisentido capaces de inhibir la traducción y/o transcripción de un gen que codifica una subunidad de la secuencia nativa del polipéptido del receptor de IL-23, señuelos, p. ej. señuelos genéticos de un gen del receptor de IL-23, etc. La invención usa antagonistas que son anticuerpos anti-IL-23 o anti-receptor de IL-23.

El término “agonista” se usa en el presente documento en el sentido más amplio. Un agonista de IL-23 es cualquier molécula que mimetice una actividad biológica mediada por una secuencia nativa de IL-23, independientemente del mecanismo subyacente. La actividad biológica preferiblemente es la capacidad para inducir la producción de la IL-17 en linfocitos T activados. Los ejemplos de agonistas de IL-23 incluyen, sin limitación, anticuerpos agonistas contra una subunidad, p. ej., una subunidad IL-12R $\beta$ 1 o IL-23R, de un receptor de IL-23 nativo, péptidos y moléculas orgánicas pequeñas.

“Oligodesoxinucleótidos antisentido” u “oligonucleótidos antisentido” (cuyas expresiones se usan de forma intercambiable) se definen como moléculas de ácido nucleico que pueden inhibir la transcripción y/o traducción de genes diana de una forma específica de la secuencia. El término “antisentido” se refiere al hecho de que el ácido nucleico es complementario a la secuencia genética codificante (“homosentido”) del gen diana. Los oligonucleótidos antisentido hibridan en una orientación antiparalela al ARNm en desarrollo mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick. Mediante la unión al molde del ARNm diana, los oligonucleótidos antisentido bloquean la traducción satisfactoria de la proteína codificada. El término incluye específicamente agentes llamados “ribozimas” que se han diseñado para inducir la escisión catalítica de un ARN diana, por adición de una secuencia que tiene actividad de autoempalme natural (Warzocha y Wotowiec, “Antisense strategy: biological utility and prospects in the treatment of hematological malignancies”. *Leuk. Lymphoma* 24:267-281 [1997]).

El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo antagonista, p. ej., anticuerpos neutralizantes y anticuerpos agonistas), anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos), así como fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la o las cadenas son idénticas u homólogas a secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presentan la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. n° 4.816.567; Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 [1984]). Los anticuerpos monoclonales incluyen además anticuerpos “humanizados” o fragmentos de los mismos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen al antígeno) que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una CDR del receptor son desplazados por los restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de Fv de la FR de la inmunoglobulina humana son sustituidos por los correspondientes restos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o secuencias de la región armazón. Estas modificaciones se hacen para refinar y maximizar más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá, de forma óptima, al menos una parte de la región constante (Fc) de una inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); y Reichmann y col., *Nature*, 332:323-329 (1988). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo PRIMA-TIZED® en el que la región de unión al antígeno del anticuerpo deriva de un anticuerpo producido por inmunización de monos macacos con el antígeno de interés.

Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv fragmentos; dianticuerpos; anticuerpos lineales (Zapata y col., *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995)); moléculas de anticuerpos de una cadena; y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

Como se usa en el presente documento, la expresión “enfermedad inflamatoria” o “trastorno inflamatorio” se refiere a estados patológicos que dan como resultado inflamación, normalmente causada por quimiotaxis neutrófila. Los ejemplos de dichos trastornos incluyen enfermedades inflamatorias de la piel incluyendo psoriasis y dermatitis atópica; escleroderma sistémico y esclerosis; respuestas asociadas con enfermedad inflamatoria del intestino (EII) (tal como enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa); trastornos de reperusión isquémica incluyendo lesión por re-

perfusión de tejido quirúrgico, afecciones isquémicas miocárdicas tales como infarto de miocardio, paro cardiaco, reperfusión después de cirugía cardiaca y constricción después de angioplastia coronaria transluminal percutánea, accidente cerebrovascular y aneurismas aórticos abdominales; edema cerebral secundario de accidente cerebrovascular; tiamatismo craneal; choque hipovolémico; asfixia; síndrome de dificultad respiratoria en el adulto; lesión de pulmón aguda; enfermedad de Behcet; dermatomiositis; polimiositis; esclerosis múltiple (EM); dermatitis; meningitis; encefalitis; uveítis; osteoartritis; nefritis lúpica; enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide (AR), síndrome de Sjorgen, vasculitis; enfermedades que implican diapédesis de leucocitos; trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC), síndrome de lesión multiorgánica secundaria a septicemia o traumatismo; hepatitis alcohólica; neumonía bacteriana; enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo incluyendo glomerulonefritis; sepsis; sarcoidosis; respuestas inmunopatológicas a trasplante de tejido/órganos; inflamaciones del pulmón, incluyendo pleuresía, alveolitis, vasculitis, neumonía, bronquitis crónica, bronquiectasia, panbronquiolitis difusa, neumonitis por hipersensibilidad, fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y fibrosis quística; etc. Las indicaciones preferidas incluyen, sin limitación, inflamación crónica, diabetes autoinmune, artritis reumatoide (AR), espondilitis reumatoide, artritis gotosa y otras afecciones artríticas, esclerosis múltiple (EM), asma, lupus eritematoso sistémico, síndrome de dificultad respiratoria en el adulto, enfermedad de Behcet, psoriasis, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, reacción de injerto contra huésped, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Alzheimer y pirosis, junto con cualquier enfermedad o trastorno que esté relacionado con la inflamación y trastornos relacionados.

Los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico indeseado. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos deseados o beneficiosos incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estabilización (es decir, no hay empeoramiento) del estado patológico, retraso o ralentización del avance de la enfermedad, mejora o alivio del estado patológico, y remisión (sea parcial o total), sea detectable o indetectable. El “tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia comparado con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Los que necesitan 5 tratamiento incluyen los que ya tienen la afección o trastorno así como los propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que se va a prevenir la afección o trastorno.

La administración “crónica” se refiere a la administración del o de los agentes de una forma continua en oposición a un modo agudo, para así mantener el efecto deseado durante un periodo de tiempo prolongado.

La administración “intermitente” es el tratamiento que no se hace consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

Un “sujeto” es un vertebrado, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

El término “mamífero” se usa en el presente documento para referirse a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo sin limitación, seres humanos, animales domésticos y animales de granja, y animales de zoológico, deportes o mascotas, tales como ovejas, perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero en el presente documento es un ser humano.

Una “cantidad eficaz” es una cantidad suficiente para producir resultados terapéuticos (incluyendo preventivos) beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones.

## B. Modos de llevar a cabo la invención

La práctica de la presente invención usará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que pertenecen a la técnica. Dichas técnicas se explican íntegramente en la bibliografía, tal como “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2a edición (Sambrook y col., 1989); “Oligonucleotide Synthesis” (M.J. Gait, ed., 1984); “Animal Cell Culture” (R.I. Freshney, ed., 1987); “Methods in Enzymology” (Academic Press, Inc.); “Handbook of Experimental Immunology”, 4ª edición (D.M. Weir & C.C. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987); “Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells” (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); “Current Protocols in Molecular Biology” (F.M. Ausubel y col., eds., 1987); “PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis y col., eds., 1994); y “Current Protocols in Immunology” (J.E. Coligan y col., eds., 1991).

Como se ha descrito antes, la invención se basa en el reconocimiento de que la IL-23 induce la producción de IL-17 en linfocitos T activados, en particular células de memoria, y que los antagonistas de la IL-23 son capaces de inhibir este proceso. Por consiguiente, los antagonistas de la IL-23 son candidatos a fármacos prometedores para el tratamiento de afecciones inflamatorias caracterizadas por niveles elevados de IL-17. A la inversa, aunque no se reivindica, los agonistas de la IL-23 son útiles para inducir una respuesta inmunitaria protectora frente a diferentes infecciones, incluyendo infecciones micobacterianas, tales como por ejemplo, infección por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*).

## ES 2 329 673 T3

### 1. Ensayos de selección para identificar antagonistas o agonistas de IL-23

Esta invención incluye ensayos de selección para identificar antagonistas de IL-23, que son útiles en el tratamiento de afecciones inflamatorias caracterizadas por la presencia de niveles elevados de IL-17. Aunque no se reivindica, los ensayos de selección pueden identificar agonistas de IL-23 que son útiles para estimular una respuesta inmunitaria protectora frente a infecciones, tales como infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*.

Los ensayos de selección de antagonistas candidatos a fármacos se pueden diseñar para identificar compuestos que se unen o forman complejo con la IL-23 (incluyendo una subunidad u otro fragmento de la misma) o con un receptor de IL-23 (incluyendo una subunidad u otro fragmento del mismo), o que interfieran de otra forma con la interacción de la IL-23 con otras proteínas celulares, interfiriendo de esta forma con la producción o funcionamiento de la IL-23. Los ensayos de selección proporcionados en el presente documento incluyen ensayos que son adecuados para selecciones de alto rendimiento de bibliotecas químicas, que los hacen particularmente adecuados para identificar moléculas pequeñas candidatas a fármacos. En general, se proporcionan ensayos de unión y ensayos de actividad.

Los ensayos se pueden realizar en una variedad de formatos, incluyendo, sin limitación, ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de selección bioquímicos, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

Todos los ensayos para los antagonistas y agonistas son comunes en cuanto que requieren poner en contacto el candidato a fármaco con un polipéptido de IL-23 o un polipéptido del receptor de IL-23, o un fragmento de dichos polipéptidos (que incluyen específicamente subunidades de IL-23 y del receptor de IL-23) en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen. Por ejemplo, la subunidad p19 de la IL-23 es un polipéptido de 189 aminoácidos, cuya secuencia está disponible en la base de datos EMBL con el número de acceso AF301620 (NCBI605580; GenBank AF301620; Oppmann y col., véase antes). La secuencia de la subunidad p40 del polipéptido IL-23 también es conocida (también llamada subunidad IL-12 p40; NCBI 161561). La secuencia de IL-12R $\beta$ 1, a la que se une IL-23, está disponible con el número de acceso NCBI 601604. El hacer que estos anticuerpos o moléculas pequeñas se unan a dichos polipéptidos, es conocido para el experto en la técnica.

En los ensayos de unión, la interacción es la unión, y el complejo formado se puede aislar o detectar en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido de IL-23 o del receptor de IL-23 o el candidato a fármaco se inmovilizan en una fase sólida, p. ej., una placa de microtitulación, mediante enlaces covalentes o no covalentes. El enlace no covalente normalmente se lleva a cabo por recubrimiento de la superficie sólida con una disolución del polipéptido de la IL-23 o del receptor de IL-23 y secado. Alternativamente, se puede usar un anticuerpo inmovilizado, p. ej. un anticuerpo monoclonal, específico para inmovilizar el polipéptido de IL-23 o el polipéptido del receptor de IL-23, para anclarlo en una superficie sólida. El ensayo se lleva a cabo por adición del componente no inmovilizado, que se puede marcar con un marcador detectable, al componente inmovilizado, p. ej., la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando la reacción se completa, se separan los componentes que no han reaccionado, p. ej. por lavado, y se detectan los complejos anclados sobre la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado lleva un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado sobre la superficie indica que se produce la formación de complejo. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no lleva un marcador, la formación del complejo se puede detectar, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato es un polipéptido que interactúa pero no se une a IL-23 o el receptor de IL-23, su interacción con el respectivo polipéptido se puede ensayar por procedimientos conocidos para detectar las interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen procedimientos tradicionales, tales como por ejemplo, entrecruzamiento, coimmunoprecipitación y copurificación por gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína se pueden seguir usando un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores (Fields y Song, *Nature* (London), 340:245-246 (1989); Chien y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)) como describen Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en 2 dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como dominio de unión al ADN y el otro que funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión de levaduras descrito en las publicaciones anteriores (en general denominado "sistema del doble híbrido") aprovecha esta propiedad, y usa 2 proteínas híbridas, una en la que la proteína diana se fusiona con el dominio de unión al ADN de GAL4, y otra, en la que las proteínas activantes candidato se fusionan con el dominio de activación. La expresión de un gen indicador GAL1-*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 por la interacción proteína-proteína. Las colonias que 0 contienen polipéptidos que interactúan se detectan con un sustrato cromogénico para la  $\beta$ -galactosidasa. Hay un kit completo (MATCHN4AYER<sup>TM</sup>) para identificar interacciones proteína-proteína entre 2 proteínas específicas usando la técnica de doble híbrido, disponible en el comercio en Clontech. Este sistema también se puede extender a la cartografía de dominios de proteína implicados en interacciones de proteínas específicas, así como a la determinación con precisión de los restos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

Los compuestos que interfieren con la interacción de la IL-23 y otros componentes intra o extracelulares, en particular la IL-17, se pueden ensayar como sigue. Normalmente, se prepara una mezcla de reacción que contiene IL-23 y el componente intra o extracelular (p. ej. IL-17) en condiciones y durante un tiempo que permita la interacción de los dos productos. Para ensayar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la interacción de la IL-23 e

IL-17, la reacción se lleva a cabo en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción, para servir como control positivo. Puesto que se ha mostrado que la IL-23 induce la producción de IL-17, se puede ensayar la capacidad del compuesto de ensayo para inhibir la interacción IL-23/IL-27, por ejemplo, midiendo la cantidad de IL-17 en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Si la cantidad de IL-17 es menor en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato es un antagonista de IL-23 por la definición de la presente invención.

Los antagonistas de la IL-23 identificados basándose en su capacidad para inhibir la inducción de la producción de IL-17 por la IL-23, son candidatos a fármaco para el tratamiento de afecciones inflamatorias caracterizadas por la presencia de niveles elevados de IL-17.

Los agonistas de la IL-23 identificados por su capacidad para promover la inducción de la producción de IL-17 por la IL-23 son candidatos a fármaco por provocar o mantener una respuesta inmunitaria protectora frente a infecciones, tales como infección por *Mycobacterium tuberculosis*, y como resultado, para el tratamiento de enfermedades infecciosas, tales como la tuberculosis.

Hay que destacar que los ensayos de selección específicamente descritos en el presente documento, son solo para ilustrar. Los expertos en la técnica conocen una variedad de ensayos diferentes, que se pueden seleccionar dependiendo del tipo de candidatos a antagonista seleccionados (p. ej., polipéptidos, péptidos, moléculas orgánicas pequeñas no peptídicas, ácido nucleico, etc.) y son igualmente adecuados para los propósitos de la presente invención.

## 2. Anticuerpos anti-IL-23 y anti-receptor de IL-23

En una realización particular, los antagonistas de IL-23 son anticuerpos monoclonales contra la IL-23 (p. ej., una subunidad de la IL-23), incluyendo fragmentos de anticuerpos. En otra realización particular, los antagonistas de IL-23 incluyen anticuerpos monoclonales contra un receptor de IL-23 (p. ej., una subunidad de un receptor de IL-23). La IL-23, incluyendo sus subunidades, se ha discutido en lo que antecede. El receptor para la IL-23 está compuesto de 2 subunidades, IL-12R $\beta$ 1, y una subunidad descubierta más recientemente llamada IL-23R (Parham y col., *J. Immunol.* 168:5699-5798 (2002)). Los anticuerpos contra cualquiera de las subunidades están específicamente dentro del alcance de la invención. En el caso de los antagonistas, son particularmente preferidos los anticuerpos que se unen específicamente a la subunidad IL-23R, ya que bloquean específicamente las actividades biológicas mediadas por la IL-23.

Los procedimientos para hacer anticuerpos monoclonales son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, normalmente se inmuniza un ratón, hámster u otro animal huésped adecuado, con un agente de inmunización para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente de inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

El agente de inmunización normalmente incluirá el polipéptido de IL-23 o del receptor de IL-23 o una proteína de fusión del mismo. En general, se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o células de nódulo linfático si se desean fuentes de mamíferos no humanas. Después, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas normalmente son células de mamífero transformadas, en particular células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Normalmente, se usan líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células hibridomas se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas, no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan un nivel de expresión alto estable del anticuerpo de las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63].

Después, se puede ensayar en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hibridomas la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra IL-23 o un receptor de IL-23. Preferiblemente, la especificidad de la unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células hibridomas se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de identificar las células híbridomas deseadas, los clones se pueden subclonar por procedimientos de dilución límite y hacer crecer por procedimientos estándar [Goding, véase antes]. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de híbrido se pueden hacer crecer *in vivo* como ascitis en un mamífero.

5 Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o fluido ascítico por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharosa, hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

10 Los anticuerpos monoclonales también se pueden hacer por procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente de EE.UU. n° 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se puede aislar fácilmente y secuenciar usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos). Las células híbridomas de la invención sirven como fuente preferida para dicho ADN. Una vez aislado, el  
15 ADN se puede poner en vectores de expresión, que después se transfieren a células huésped, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de lo contrario no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo los dominios constantes de la cadena pesada y ligera humanas por secuencia codificante, en lugar de las secuencias murinas homólogas [Patente de EE.UU. n° 4.816.567; Morrison y col., véase antes], o por unión covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es de inmunoglobulina. Dicho polipéptido que no es de inmunoglobulina se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención o se puede sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención, para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

25 Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera de la inmunoglobulina y la cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc de modo que se prevenga el entrecruzamiento de la cadena pesada. Alternativamente, los restos de cisteína relevantes se sustituyen por otros restos de aminoácidos o se eliminan de modo que se prevenga el entrecruzamiento. Los procedimientos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes.

Los anticuerpos anti-IL-23 y anti-receptor de IL-23 de la invención pueden ser además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen al antígeno) que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por los restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad,  
40 afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la Fv de la región armazón de la inmunoglobulina humana son sustituidos por los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o secuencias de la región armazón. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá, de forma óptima, al menos una parte de una región constante (Fc) de una inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana [Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); y Reichmann y col., *Nature*, 332:323-329 (1988)].

50 Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanizados son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en el mismo, de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos "importados", que normalmente se toman de un dominio variable "importado". La humanización se puede llevar a cabo esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann y col., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen y col., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], sustituyendo las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano por las secuencias de la CDR o las CDR de roedores. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. n° 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR  
60 y posiblemente algunos restos de la FR se sustituyen por restos de sitios análogos de anticuerpos de roedores.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando diferentes técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de presentación de fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. También están disponibles las técnicas de Cole y col. y Boerner y col. para preparar anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991)). Igualmente, se pueden hacer anticuerpos humanos introduciendo locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, p. ej., ratones en los que se han inactivado parcial o completamente los genes de las inmunoglobulinas endógenas. Tras la estimulación, se observa la producción de

anticuerpos humanos, que se parecen mucho a los observados en los seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la reorganización de genes, montaje y repertorio de anticuerpos. Este procedimiento se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks y col., *Bio/Technology* 10,779-783 (1992); Lonberg y col., *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild y col., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995).

Mendez y col. (*Nature Genetics* 15:146-156 (1997)) han mejorado más la tecnología y han generado una línea de ratones transgénicos denominada "Xenorotón II" que cuando se estimula con un antígeno, genera anticuerpos completamente humanos de alta afinidad. Esto se logró por integración de la línea germinal de los locus de la cadena pesada y la cadena ligera de megabases en ratones con delección en el segmento J<sub>H</sub> endógeno, como se ha descrito antes. El Xenorotón II alberga 1.020 kb del locus de la cadena pesada humana que contiene aproximadamente 66 genes de V<sub>H</sub>, las regiones D<sub>H</sub> y J<sub>H</sub> completas y 3 regiones constantes diferentes ( $\mu$ ,  $\delta$  y  $\chi$ ), y también alberga 800 kb del locus  $\kappa$  que contiene 32 genes de V <sub>$\kappa$</sub> , segmentos J <sub>$\kappa$</sub>  y genes C <sub>$\kappa$</sub> . Los anticuerpos producidos en estos ratones se parecen mucho a los observados en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la reorganización de genes, unión y repertorio. Los anticuerpos humanos se expresan con preferencia frente a los anticuerpos endógenos debido a la delección del segmento JH endógeno que previene la reorganización de genes en los locus murinos.

Alternativamente, se puede usar la tecnología de presentación de fagos (McCafferty y col., *Nature* 348, 552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulinas de donantes inmunizados. Según esta técnica, se clonan los genes del dominio V del anticuerpo en el armazón en un gen de proteína de la cubierta mayoritario o minoritario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por lo tanto, el fago mimetiza algunas de las propiedades de los linfocitos B. La presentación de fagos se puede llevar a cabo en una variedad de formatos; para su revisión véase, p. ej., Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3, 564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos del gen V para la presentación de fagos. Clackson y col., *Nature* 352, 624-628 (1991) aislaron un conjunto diverso de anticuerpos antioxazolona de una genoteca combinatoria aleatoria pequeña genes V derivados de bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos inmunizados y se pueden aislar anticuerpos de un conjunto diverso de antígenos (incluyendo autoantígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991), o Griffith y col., *EMBO J.* 12, 725-734 (1993). En una respuesta inmunitaria natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones con una alta tasa (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán una mayor afinidad, y los linfocitos B que presentan inmunoglobulina de superficie de alta afinidad se replican y diferencian con preferencia durante la posterior estimulación por el antígeno. Este proceso natural se puede mimetizar usando la técnica conocida como "intercambio de cadena" (Marks y col., *Bio/Technol.* 10, 779-783 [1992]). En este procedimiento, la afinidad de anticuerpos humanos "primarios" obtenidos por presentación de fago, se puede mejorar mediante la sustitución secuencial de los genes de la región V de las cadenas pesadas y ligeras por repertorios de variantes naturales (repertorios) de genes del dominio V obtenidos de donantes inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo de nM. Han descrito una estrategia para hacer repertorios de anticuerpos de fagos muy grandes, Waterhouse y col., *Nucl. Acids Res.* 21, 2265-2266 (1993).

Se han desarrollado diferentes técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, p. ej., Morimoto y col., *J. Biochem. Biophys. Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan y col., *Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora se pueden producir directamente por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter y col., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). En otra realización, el F(ab')<sub>2</sub> se forma usando la cremallera de leucina GCN4 para promover el montaje de la molécula F(ab')<sub>2</sub>. Según otro procedimiento, los fragmentos Fv, Fab o F(ab')<sub>2</sub> se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el experto en la técnica.

Los anticuerpos heteroconjugados, compuestos de 2 anticuerpos covalentemente unidos, también están dentro del alcance de la presente invención. Se han propuesto dichos anticuerpos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente de EE.UU. n° 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por el VIH (publicación de las solicitudes PCT WO 91/00360 y WO 92/200373). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden hacer usando cualesquiera procedimientos de entrecruzamiento, usando agentes de entrecruzamiento disponibles en el comercio, bien conocidos.

Para información adicional relativa a la producción de anticuerpos monoclonales, véase también Goding, J.W., *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 3ª edición, Academic Press, Inc., London, San Diego, 1996; Liddell y Weeks: *Antibody Technology: A Comprehensive Overview*, Bios Scientific Publishers: Oxford, UK, 1995; Breitling y Dubel: *Recombinant Antibodies*, John Wiley & Sons, New York, 1999; y *Phage Display: A Laboratory Manual*, Barbas y col., editors, Cold Springs Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2001.

### 3. Enfermedades diana

La IL-17 se ha implicado en diferentes enfermedades inflamatorias, incluyendo la artritis reumatoide (AR). Una de las características principales de la AR es la erosión del hueso periarticular. Los osteoclastos tienen una función principal en la resorción ósea, pero los mecanismos por los cuales se forman los osteoclastos a partir de las células progenitoras no se entiende completamente. Recientemente, Kotake, y col. (*J. Clin. Invest.* 103:1345 (1999)) publicaron que la interleuquina 17 (IL-17) podía inducir la formación de células de tipo osteoclasto, en cocultivos de células hematopoyéticas de ratón y osteoblastos primarios. Se mostró que esta osteoclastogénesis inducida por la IL-17 era inhibida por la indometacina, un inhibidor selectivo de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Se encontró que los líquidos sinoviales de pacientes con AR contenían niveles significativamente elevados de IL-17 comparado con los pacientes con osteoartritis (OA). Además, usando la inmunotinción, se detectaron células mononucleares positivas para IL-17 en los tejidos sinoviales de pacientes con AR y no en tejidos de pacientes con OA. Se ha interpretado que estos descubrimientos indican que la IL-17 puede contribuir a la erosión ósea y daño de la articulación en la AR y por lo tanto, puede ser una diana para la inhibición.

Los pacientes con la enfermedad de Behcet también han mostrado niveles en el suero sorprendentemente elevados de IL-17 comparado con sujetos sanos. Hamzaoui y col., *Scand. J. Rheumatol.* 31(4):205-10 (2002).

Se han encontrado niveles elevados de IL-17 en vías aéreas asmáticas, y se ha sugerido que la IL-17 podría amplificar las respuestas inflamatorias mediante la liberación de otros mediadores proinflamatorios, tales como citoquinas alfa. Molet y col., *J. Allergy Clin. Immunol.* 108(3):430-8 (2001); y Wong y col., *Clin. Exp. Immunol.* 125(2):177-83 (2001).

Se han descrito niveles elevados de IL-17 en pacientes con lupus eritematoso sistémico. Wong y col., *Lupus* 9(8):589-93 (2000).

Se ha descrito que la IL-17 tiene una función en la psoriasis. Homey y col., *J. Immunol.* 164(12):6621-32 (2000).

Se ha publicado que el ARNm de la IL-17 es mayor en células mononucleares de la sangre y LCR en la esclerosis múltiple. Matusevicius y col., *Mult. Scler.* 5(2): 101-4 (1999).

Basándose en estas y en numerosas publicaciones similares, los antagonistas de IL-23, que inhiben la capacidad de la IL-23 para inducir la producción de IL-17 y por lo tanto menores niveles de IL-17, son candidatos valiosos para el tratamiento de una variedad de afecciones y enfermedades inflamatorias (crónicas). Los ejemplos de dichas afecciones y enfermedades incluyen, sin limitación: inflamación crónica, diabetes autoinmune, artritis reumatoide (AR), espondilitis reumatoide, artritis gotosa y otras afecciones artríticas, esclerosis múltiple (EM), asma, lupus eritematoso sistémico, síndrome de dificultad respiratoria en el adulto, enfermedad de Behcet, psoriasis, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, reacción de injerto frente a huésped, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Alzheimer y piresis.

Se sabe que la IL-17 tiene una función importante en la generación de una respuesta protectora para determinadas enfermedades infecciosas, tales como la tuberculosis, promoviendo la producción de IFN- $\gamma$  e induciendo así una respuesta inmunitaria mediada por células. Por consiguiente, los agonistas de la IL-23, incluyendo anticuerpos agonistas, son útiles para inducir una respuesta inmunitaria mediada por células contra diferentes infecciones, tales como la tuberculosis causada por *Mycobacterium tuberculosis*, y son candidatos a fármacos prometedores para tratar estas enfermedades infecciosas que matan más de 3 millones de personas al año en todo el mundo.

### 4. Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos que se unen específicamente a la IL-23 o receptor de la IL-23, así como otras moléculas antagonistas de la IL-23 identificadas en los ensayos de selección descritos en lo que antecede, se pueden administrar para el tratamiento de diferentes trastornos, en particular enfermedades inflamatorias o enfermedades que se benefician de la inducción de una respuesta inmunitaria mediada por células, en forma de composiciones farmacéuticas.

Cuando se usan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas de péptidos que retengan la capacidad de unión a la secuencia de la proteína diana. Dichos péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o producir por tecnología de ADN recombinantes. Véase, por ejemplo, Marasco y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893(1993).

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en microemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Pharmaceutical Sciences* de Remington, véase antes.

Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

## ES 2 329 673 T3

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. n° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico). Mientras que polímeros tales como el etileno-acetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas a lo largo de 100 días, algunos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un periodo de tiempo largo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado a la exposición a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y a posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden planificar estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlace S-S intermolecular a través del intercambio de tiodisulfuro, la estabilización se puede lograr modificando los restos sulfhidrilo, liofilizando las disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados, y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferiblemente con actividades complementarias que no afecten adversamente una a la otra. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido, o se pueden formular por separado y administrar simultánea o consecutivamente, en cualquier orden.

Por ejemplo, los antagonistas de IL-23 de la presente invención se pueden administrar en combinación con agentes antiinflamatorios y otros compuestos activos que se usan actualmente para el tratamiento de las enfermedades y afecciones diana. Dichos compuestos incluyen corticoesteroides; fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como aspirina, ibuprofeno, e inhibidores de la COX-2, p. ej. Celebrex® y Vioxx®; fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), tales como metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, azatioprina, ciclosporina, hidroxicloroquina y D-penicilamina; y modificadores de la respuesta biológica (MRB), tales como TNF e inhibidores de la IL-1.

Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con propósitos ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna forma.

### Ejemplo 1

*La interleuquina-23 (IL-23) promueve un estado de activación de linfocitos T CD4 distinto caracterizado por la producción de interleuquina 17 (IL-17)*

Aunque es producida claramente por los linfocitos T activados, las publicaciones previas no han proporcionado una clasificación clara de la IL-17 dentro del paradigma de los perfiles de citoquinas polarizadas Th1 y Th2. El propósito de los experimentos iniciales descritos en este ejemplo, era examinar la posibilidad de que la IL-17 sea expresada en respuesta a señales diferentes de las asociadas con la respuesta de Th1 o Th2.

### *Procedimientos experimentales*

**Cultivo celular-** Se prepararon suspensiones unicelulares de bazo a partir de ratones C57/BL-6, y se aislaron células mononucleares de esplenocitos suspendidos por centrifugación en gradiente de densidad. Se cultivaron  $2 \times 10^6$  células/ml con IL-2 (100 unidades/ml) en presencia o ausencia de diferentes estímulos (durante los tiempos indicados en las leyendas de las figuras), después de lo cual las células se recogieron y se analizó la IL-17 usando ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Se obtuvieron células dendríticas de macrófagos (obtenidos como población adherente de suspensión de esplenocitos) por tratamiento de macrófagos con rGM-CSF (2 ng/ml) y rIL-4 (1000 unidades/ml) durante 4 días, lavado y reactivación usando LPS (0,5  $\mu$ g/ml). Se aislaron linfocitos T de memoria e indiferenciados por tinción de las células mononucleares aisladas de la suspensión unicelular de esplenocitos murinos con CyC-CD4 + PE-CD44 o CyC-CD4 + PE-CD62L y separación de las células CD4<sup>+</sup> que eran CD44<sup>alto</sup>/CD62L<sup>bajo</sup> para el fenotipo de memoria, o CD44<sup>bajo</sup>/CD62<sup>alto</sup> para el fenotipo indiferenciado.

**Inducción *in vitro* de la diferenciación de linfocitos T-** Las células CD4<sup>+</sup> se purificaron del bazo de ratones C57/BL6 salvaje usando perlas magnéticas anti-CD4 (Miltenyi Biotech). Los linfocitos T purificados ( $2 \times 10^6$  células/ml) se activaron durante 3 días por siembra en placas recubiertas con anticuerpos anti-CD3 5  $\mu$ g/ml y anti-CD28 1 g/ml. Los cultivos se complementaron con IL-2 y se trataron con IL-12 (20 mM) + anti-IL4 (0,5  $\mu$ g/ml) (para la diferenciación de Th1), o IL-23 (10 nM) (para la producción de IL-17). Después de la activación inicial, los cultivos celulares se lavaron extensamente y se reestimularon con anti-CD3 (1  $\mu$ g/ml) durante otras 24 h, después de lo cual se analizó en los líquidos sobrenadantes de las células diferentes citoquinas secretadas, usando ELISA.

**Inhibición por el anticuerpo IL-12p40 de la inducción de IL-17-** Se preincubaron el anticuerpo anti-IL-12 (R&D Systems, n° de catálogo AF-419-NA) o un anticuerpo de control no relacionado (anti-FGF-8b (R&D Systems, n° de

## ES 2 329 673 T3

catálogo AF-423-NA) con IL-23 (100 ng/ml) o medio condicionado de células dendríticas estimuladas por LPS (10% v/v) durante 1 h a 37°C y después se incubaron durante otros 5-6 días con células mononucleares aisladas de bazo de ratón ( $2 \times 10^6$  células/ml). Se recogieron los líquidos sobrenadantes y se midieron los niveles de IL-17 usando ELISA.

5 *Purificación de IL-23-IL-23 murina*- El componente de IL-23 se produjo por coexpresión de p19 marcado con His en el carboxilo terminal y p40 marcado con FLAG en células de riñón embrionario humano (293 células) y la proteína segregada se purificó mediante resina de afinidad de níquel. Los niveles de endotoxinas eran indetectables con menos de 0,2 unidades de endotoxinas por  $\mu\text{g}$ .

### 10 *Resultados*

Primero, se examinó la capacidad de diferentes productos microbianos para estimular la producción de IL-17. Recientemente, Infante-Duarte y col., *J. Immunol.* 165, 6107 (2000), han observado un aumento de IL-17 en respuesta a lipopéptidos microbianos de una enfermedad de Lyme que causa la espiroqueta *B. burgdorferi*. Los cultivos de células de bazo en presencia de diferentes péptidos microbianos incluyendo LPS (bacterias Gram negativas), LTA (bacterias Gram positivas) o LBP (lipopéptido bacteriano) dieron como resultado la producción de IL-17 (Figura 1). Ni los linfocitos T purificados solos, ni los propios macrófagos purificados producían IL-17. Los linfocitos T purificados, tras entrecruzamiento con el receptor usando anti-CD3 unido a la placa y tratamiento con líquidos sobrenadantes de macrófagos/células dendríticas activadas, producían más IL-17 indicando la presencia de un factor o factores no identificados liberados por estas células que actúan sobre los linfocitos T para promover la producción de IL-17.

En el perfil de la expresión de las moléculas candidatas que podrían ser responsables de esta actividad de promoción de la IL-17, se observó un aumento de 100-1000 veces de la expresión del ARNm de los componentes p19 y p40 de la IL-23 (B. Oppmann y col., *Immunity* A3, 715 (2000)) en células dendríticas activadas usando la RT-PCR en tiempo real (no se muestra), y por lo tanto se examinó el efecto de la IL-23.

El componente de la IL-23 se produjo por coexpresión de p19 marcado con His en el carboxilo terminal y p40 marcado con Flag en células de riñón embrionario humano (293 células) y la proteína secretada se purificó por resina de afinidad de níquel. Los niveles de endotoxinas eran indetectables con menos de 0,2 UE por  $\mu\text{g}$ . Los cultivos de células de bazo se incubaron en presencia de IL-2 (100 U/ml) y ConA (2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en condiciones de inducción de Th1 (IL-12 + anti-IL-4), condiciones de inducción de Th2 (IL-4 + anti-IFN- $\gamma$ ) o IL-23 purificada (100 ng/ml) durante 3-4 días, después de lo cual se lavaron los cultivos y se reestimularon con ConA durante otras 24 horas. Se midieron los niveles de diferentes citoquinas usando ELISA. Los niveles menores que la dilución más baja del intervalo de la curva patrón del kit para ELISA, se registraron como "no detectable" (N.D.). Los siguientes resultados son representativos de 3 experimentos realizados independientemente.

Células de bazo, cultivadas en condiciones de inducción de Th1 estimuladas con IL-12 dieron como resultado la producción marginal de IL-17, mientras que en las condiciones de inducción de Th2 no hubo aumento de la producción de IL-17 respecto de los controles. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 1.

TABLA 1

	Control	IL-12	IL-4	IL-23
IL-17	N.D.	58 $\pm$ 82	64 $\pm$ 91	1191 $\pm$ 569
IL-4	50 $\pm$ 26	396 $\pm$ 17	3259 $\pm$ 118	101 $\pm$ 100
IFN- $\gamma$	341 $\pm$ 0	2757 $\pm$ 1016	489 $\pm$ 502	580 $\pm$ 813
GM-CSF	N.D.	46 $\pm$ 13	365 $\pm$ 516	882 $\pm$ 169
TNF- $\alpha$	N.D.	174 $\pm$ 40	214 $\pm$ 314	205 $\pm$ 85

La presencia de IL-23 en cultivos dio como resultado un alto nivel de producción de IL-17, de una forma dependiente de la dosis (Figura 2). La IL-23 también dio como resultado niveles mayores de GM-CSF que los observados en las condiciones de inducción de Th1. En contraste, los niveles de IFN- $\gamma$  eran significativamente menores que los obtenidos en las condiciones de inducción de Th1. Los niveles de TNF- $\alpha$  eran similares a los de las condiciones de Th1. IL-12p40 sola no dio como resultado ninguna producción de IL-17 (no se muestran los datos); la IL-23 promovió niveles elevados de ARNm de IL-17 (Figura 2B). Los niveles de ARNm de IL-17 aumentaron en varios cientos de veces en 6 h de exposición a IL-23 y permanecieron elevados en la presencia continuada de IL-23. Este efecto no se inhibió por la presencia de un anticuerpo contra IL-17, sugiriendo que la propia IL-17 no estaba contribuyendo a este proceso (no se muestra). Además, también se encontró que el ARNm para IL-17F, un miembro de la familia de IL-17 recientemente identificado, era favorecido en respuesta a la IL-23 (Fig. 2C).

Se ha descrito que la IL-23 promueve la proliferación de linfocitos T de memoria pero no indiferenciados (D.M. Frucht, véase antes). Por lo tanto, se examinó el efecto de IL-23 en la producción de IL-17 de poblaciones de linfocitos T indiferenciados frente a memoria. Se aislaron linfocitos T CD4<sup>+</sup> purificados de esplenocitos por separación de células activadas por fluorescencia (FACS). La población de células de memoria se seleccionó como CD4<sup>+</sup>CD44<sup>alto</sup> (R. C. Budd y col., *J. Immunol.* 138, 3120 (1987)), o CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>bajo</sup> (T. M. Jung, W. M. Gallatin, I. L. Weissman, M. O. Dailey, *J. Immunol.* 141, 4110 (1988)), y la población de células indiferenciadas se seleccionó como CD4<sup>+</sup>CD44<sup>bajo</sup> o CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>alto</sup>. Como se ve en la figura 3, la IL-23 estimuló la producción de IL-17 solo en la población de células de memoria (CD44<sup>alto</sup> y CD62L<sup>bajo</sup>) y no en las células indiferenciadas (CD44<sup>bajo</sup> o CD62L<sup>alto</sup>).

La producción de IL-17 mediada por IL-23 se bloqueó completamente en presencia de un anticuerpo de IL-12 neutralizante que interacciona con la subunidad p40 compartida con la IL-23 (figura 4A, panel izquierdo). Este efecto no se debió a la unión de los receptores Fc en las células presentadoras de antígeno, ya que no había cambio en la producción de IL-17 en presencia del anticuerpo no relacionado. Este anticuerpo también inhibía >50 por ciento la inducción de la producción de IL-17 observada en respuesta al medio condicionado de células dendríticas estimuladas con LPS (figura 4A, panel derecho). Se observó una notable reducción, pero no eliminación de la producción de IL-17 en respuesta a la estimulación con ConA de cultivos de células de bazo de ratones que carecían del componente IL-12p40 (cepa: B6.129S1-IL12b<sup>tm1Jm</sup>) comparado con los ratones salvajes o ratones que carecían del componente IL-12p35 (cepa: B6.129S1-IL12a<sup>tm1Jm</sup>) (Figure 4B).

Con el fin de examinar la función de IL-12 en la producción de IL-17, se añadieron cantidades crecientes (0,001-1 nM) de IL-12 murino a cultivos que contenían IL-23 (1 nM). Como puede verse en la figura 5A, IL-12 disminuía los niveles de IL-17 de una forma dependiente de la dosis.

Además, los esplenocitos de ratones que carecían de la cadena 2 beta del receptor de IL-12 (IL-12Rβ2) (Wu y col., *J. Immunol.* 165, 6221 (2000)), el componente del receptor específico de IL-12 (A.O. Chua, V.L. Wilkinson, D.H. Presky, U. Gubler, *J. Immunol.* 155, 4286 (1995)), se trataron con IL-23 purificada. Los esplenocitos de los ratones IL-12Rβ2<sup>-/-</sup> respondían al estímulo de IL-23 aumentando la producción de IL-17 frente al control no estimulado (figura 5B) sin afectar a los niveles de IFN-gamma. Sorprendentemente, los niveles base de IL-17 en estos ratones eran más de 10 veces comparado con los ratones salvajes, sugiriendo una posible disminución por IL-12 de la producción de IL-17 inducida por IL-23. Sin embargo, en contraste con los ratones inactivados para IL-12Rβ2, los autores de la invención no observaron aumento de IL-17 en cultivos de bazo de ratones inactivados para IL-12p35. Las razones de esta diferencia no se conocen, pero pueden estar relacionadas con la alteración de la función de IL-12p40 en ausencia de p35, o diferencias en el contexto genético o exposición a patógenos.

### 35 *Discusión*

Considerados juntos, estos datos sugieren una función de la IL-23 en la promoción de un estado de activación de linfocitos T diferentes que expresan la IL-17 como citoquina efectora. Los paradigmas de Th1 y Th2 se han descrito como la promoción de respuestas inmunitarias mediadas por células frente a las humorales. Estas respuestas proporcionan una defensa importante para los patógenos intracelulares y extracelulares respectivamente, y los defectos en cualquiera de estas respuestas están asociadas con una mayor susceptibilidad a patógenos específicos. En contraste, IL-23 puede servir para promover una respuesta inmunitaria adaptable frente a patógenos que se caracteriza por una fuerte dependencia de las células que se cree que funcionan principalmente como mediadores de la respuesta inmunitaria innata. La IL-17, como una citoquina efectora principal de esta respuesta, puede promover el reclutamiento más rápido de monocitos y neutrófilos a través de la producción inducida de quimioquinas. Además, el alto nivel de producción de GM-CSF observado en respuesta a la IL-23 apoya la producción de células mieloides adicionales. Esto aumenta más por la producción de G-CSF a partir de células de estroma estimuladas por IL-17 locales. Sin embargo, el carácter de esta respuesta adaptable no depende exclusivamente de las células fagocíticas de la respuesta de linaje mieloides, ya que se sabe que IL-17 promueve la inducción de ICAM por IL-17 proporcionando así una importante coestimulación de respuestas de linfocitos T adicionales.

Recientemente, varios estudios han señalado las diferencias significativas entre los ratones deficientes en p35 y los ratones deficientes en p40 (Decken y col., *Infect. Immun.* 66:4994-5000 (2002); Cooper y col., *J. Immunol.* 168:1322-1327 (2002); Elkins y col., *Infection & Immunity* 70:1936-1948; Holscher y col., *J. Immunol.* 167:6957-6966 (2001)). Estos estudios comparten la observación de que la pérdida de p40 en general es menos perjudicial que la pérdida de p35 en el aclaramiento inmunomediado de una variedad de organismos modelo.

La asociación de la expresión de IL-17 con una serie de enfermedades inflamatorias graves sugiere que los antagonistas de IL-23 pueden ser candidatos a fármacos prometedores en el tratamiento de dichas enfermedades.

### 60 Ejemplo 2

#### *Ratones deficientes en interleuquina-23 (IL-23)*

65 Para investigar más la relación entre la IL-23 y la IL-17 *in vivo*, se comparó el fenotipo de ratones deficientes en IL-23 con el de animales deficientes en IL-17.

*Procedimientos experimentales*

**Ratones:** Todos los ratones se albergaron en condiciones específicas exentas de patógenos. Los ratones IL-12p40<sup>-/-</sup> se obtuvieron del laboratorio Jackson (Bar Harbor, MA), y los C57BL/6 se obtuvieron de los laboratorios Charles River (San Diego, CA).

**Reactivos:** Salvo que se indique lo contrario, los reactivos se adquirieron en los siguientes proveedores: los anticuerpos y reactivos para ELISA se obtuvieron de BD Pharmingen (San Diego, CA), las citoquinas de R&D systems (Minneapolis, MN), los antígenos acoplados a TNP de Biosearch Technologies (Novato, CA) y los reactivos del cultivo de tejidos de Invitrogen (Carlsbad, CA).

**Generación de ratones deficientes en IL23p19.** El ADN genómico que abarca el locus murino IL23p19 se aisló del clon 198a3 de una genoteca de BAC de Genome Systems (Incyte Genomics, Palo Alto, CA). Se construyó un vector de localización diseñado para sustituir la región codificante de IL23p19 entera por un gen indicador de EGFP a partir de los siguientes fragmentos de ADN usando las técnicas de clonación molecular estándar: un casete de selección de timidina quinasa; un brazo de homología 5' de 5403 pares de bases definido por los sitios SacII y BgIII endógenos en los extremos distal y proximal, respectivamente; un casete de expresión de EGFP escindido de pEGFP-1 (BD Clontech, Palo Alto, CA) usando BamHI (extremo 5') y AflIII (extremo 3'); un casete de resistencia a PGK-neo; y un brazo corto de 1203 pb definido por un sitio XhoI endógeno en el extremo proximal y el cebador 5'-GCTTGGTGCCACCTATGAT-3' (SEQ ID NO: 1) en el extremo distal (Figura 6A). Esta construcción se electroporó en células madre embrionarias (ES) 129/SvEv (Huang y col., *Science* 259:1742 (1993)) y se produjo la recombinación homóloga en 9 de 600 clones después de selección con G418 y ganciclovir. Para verificar la localización correcta del locus, el ADN genómico de las células ES y animales se analizó por transferencia Southern. La digestión con BamHI seguido de hibridación de las membranas con la sonda 1 (un fragmento de ADN genómico de 831 pb obtenido por PCR con los oligonucleótidos 5'-AGACCCTCAAAGTTCATGAC-3' (homosentido) (SEQ ID NO: 2) y 5'-CTGACGGCGCTTTCTCTACC-3' (antisentido) (SEQ ID NO: 3)) dio un fragmento de 7027 pb para el alelo salvaje y un fragmento de 11788 pb para el alelo mutante correctamente localizado. De forma similar, la digestión del ADN genómico con EcoRI seguido de hibridación de las membranas con la sonda 2 (un fragmento de ADN genómico de 390 pb obtenido por PCR con los oligonucleótidos 5'-TTTTGCCAGTGGGATACACC-3' (homosentido) (SEQ ID NO: 4) y 5'-AACTGCTGGGGCTGTTACAC-3' (antisentido) (SEQ ID NO: 5)) dio un fragmento de 9197 pb para el alelo de salvaje y un fragmento de 6211 pb para el alelo mutante correctamente localizado. Se inyectaron 2 clones de células ES (1c5 y 3h6) en blastocitos, y se obtuvieron animales quiméricos que transmitían el alelo mutante en su línea germinal. Para el genotipado rutinario, se usó un procedimiento basado en la PCR con un cebador antisentido común (5'-GCCTGGGCTCACTTTTCTG-3') (SEQ ID NO: 6), y cebadores homosentido específico de salvaje (5'-GCGTGAAGGGCAAGGACACC-3') (SEQ ID NO: 7) y específico genomanipulado (5'-AGGGGGAGGATTGG GAAGAC-3') (SEQ ID NO: 8)). Este triplete de cebadores amplifica un fragmento de 210 pb para el alelo salvaje y un fragmento de 289 pb para el alelo mutante. La PCR se llevó a cabo en un Robocycler (Stratagene, La Jolla, CA), usando las siguientes condiciones: 1 ciclo de 94°C, 60"; 35 ciclos de 94°C, 30", 58°C, 30", 72°C, 60"; 1 ciclo de 72°C, 7".

**Análisis por FACS de subconjuntos de células sanguíneas:** Se aislaron bazo, timos y nódulos linfáticos de ratones de 6-8 semanas de edad y se prepararon suspensiones unicelulares por procedimientos estándar. La sangre periférica se obtuvo por punción cardíaca y se trató con EDTA para prevenir la coagulación y los eritrocitos se lisaron usando tampón de lisis ACK (Biosource, Camarillo, CA). Todas las células se incubaron durante 30 minutos sobre hielo en disolución salina equilibrada de Hanks (HBSS) complementada con suero de ternero bovino inactivado térmicamente al 2%. Después, las células se tiñeron en el mismo tampón con 1 µg por millón de células de diferentes anticuerpos acoplados a ficoeritrina, biotina o Cychrome™. Cuando se usaron anticuerpos biotinilados, se usaron para la detección conjugados de PE-TR (Caltag, Burlingame, CA). Después de 2 lavados con el mismo tampón, se detectó la fluorescencia usando un sistema de citometría de flujo de Epics-XL (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA).

**Estimulación de linfocitos T alotípicos:** Se aislaron linfocitos T doble positivos CD4 y CD62L de bazo de ratones balb/c de 6-8 semanas de edad mediante un protocolo de aislamiento de 2 etapas. Primero, los linfocitos T se separaron de otros tipos de células por una selección magnética negativa (Miltenyi, Auburn, CA). Después, estas células se marcaron con anticuerpos contra CD4 y CD62L y se separaron por FACS en un separador MoFlo (DakoCytometry, Fort Collins, CO). Se aislaron células dendríticas de ratones de salvaje o IL-23p19<sup>-/-</sup>, ambos en el contexto de C57BL/6, también por un protocolo de 2 etapas. Los esplenocitos CD11c positivos se seleccionaron positivamente por separación magnética (Miltenyi, Auburn, CA) antes del marcaje con anticuerpos contra CD11c, MHC de clase II y CD8. Después se separaron las células CD11c<sup>+</sup>/MHC-II<sup>+</sup>/CD8 por FACS, otra vez usando un separador MoFlo. Todas las poblaciones usadas en el experimento eran al menos 98% puras. Para provocar respuestas aloestimuladoras, se incubaron 104 células dendríticas y 10<sup>5</sup> linfocitos T en un total de 200 µl de IMDM complementados con penicilina-estreptomina y suero de ternero bovino térmicamente inactivado al 10% (Hyclone, Logan, UT) por duplicado. En algunos casos, se añadieron lipopéptidos bacterianos 100 ng/ml para estimular la producción de citoquinas por las células dendríticas. Después de 5 días de incubación, se separaron 120 µl de líquido sobrenadante para la medición de las citoquinas por ELISA, y sustitución con medio reciente que contenía 1 µCi de <sup>3</sup>H-timidina por pocillo. La incorporación de timidina se determinó 16 horas después usando un contador de centelleo de líquidos Top Count según las instrucciones del fabricante (Packard Instruments, Meriden, CT).

**Diferenciación de linfocitos T in vivo:** Se inmunizaron 4 ratones macho y 4 hembras por grupo en la pata trasera izquierda con 75 µg de hemocianina de lapa californiana (KLH) (Sigma, St. Louis, MO) en 30 µl de una emulsión 1:1

## ES 2 329 673 T3

de CFA (BD Biosciences, San Diego, CA) y PBS. Se recogió el drenaje de los nódulos linfáticos inguinales y poplíteos 5 días después y se reestimularon en IMDM complementado con penicilina-estreptomina, suero de ternero bovino térmicamente inactivado al 10% (Hyclone, Logan, UT) y KLH 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Para el ensayo de proliferación, se sembraron  $5 \times 10^5$  células en 200  $\mu\text{l}$  por triplicado, en placas de 96 pocillos, y se dejaron proliferar durante 112 horas con adición de 1  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -timidina por pocillo, durante las últimas 18 horas del periodo de incubación. La incorporación de timidina se determinó usando un contador de centelleo de líquidos Top Count según las instrucciones del fabricante (Packard Instruments, Meriden, CT). Para la secreción de citoquinas, se incubaron  $2,5 \times 10^6$  células en 1 ml en placas de 48 pocillos, y los líquidos sobrenadantes se recogieron después de 72 horas. La secreción de citoquinas se determinó por ELISA. Los datos presentados son de uno representativo de los 3 experimentos totales.

*Respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado:* Se inyectaron a 6 ratones por grupo, por vía subcutánea, 200  $\mu\text{g}$  de albúmina de suero bovino metilada (mBSA) (Sigma, St. Louis, MO) en 3 sitios en el abdomen en un total combinado de 200  $\mu\text{l}$  de una emulsión de CFA (Biosciences, San Diego, CA) y PBS 1:1. El día 8 después de inmunización, los ratones se estimularon por inyección de 20  $\mu\text{l}$  de mBSA 5 mg/ml en PBS en una pata trasera, mientras que la otra pata trasera recibió 20  $\mu\text{l}$  de PBS. Las mediciones del hinchamiento de la pata se hicieron a las 18, 42, 66 horas después de estimulación, usando un calibrador accionado por resorte serie 7 (Mitutoyo, City of Industry, CA). La magnitud de las respuestas de DTH se determinó a partir de las diferencias del grosor de la pata entre las patas a las que se inyectó antígeno y las que se inyectó PBS.

*Respuestas humorales dependientes de T y análisis de inmunoglobulina:* Para medir los niveles totales de inmunoglobulina, se obtuvo suero de ratones no inmunizados, 8 machos y 8 hembras, de 6-9 semanas de edad de cualquier genotipo. Los niveles totales de isotipos de inmunoglobulinas se midieron por ensayo de perlas Luminex (Upstate, Lake Placid, NY). Para evaluar las respuestas inmunitarias humorales específicas de OVA, se inmunizaron grupos de 7 ratones por genotipo (4 machos y 3 hembras) con OVA en CFA el día 0 y recibieron inmunizaciones de refuerzo del mismo antígeno en adyuvante incompleto de Freund (IFA) (Sigma, St. Louis, MO) los días 21 y 42. Para el análisis del suero, se obtuvo sangre por extracción de sangre retroorbital antes de la inmunización y los días 14, 28 y 49 después de inmunización. Los isotipos de inmunoglobulinas específicas de OVA se detectaron por ELISA, usando OVA como agente de captura y anticuerpos secundarios específicos de isotipo para la detección. Con el fin de estar en el intervalo lineal de ELISA, las muestras de suero se diluyeron como sigue: 1:3125000 para IgG1, 1:25000 para IgG2a, 1:625000 para IgG2b, y 1:1000 para IgG3, IgM, IgA e IgE. Se usó una serie de dilución de un suero obtenido de un ratón inmunizado con OVA de un experimento previo como patrón, puesto que los isotipos específicos de OVA, purificados, no están disponibles en el comercio. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias, en las que la media del grupo salvaje en la última extracción de sangre se fijó como 100. Para evaluar la contribución de los linfocitos T de memoria a la respuesta humoral, se inmunizaron grupos de 5-6 ratones de cualquier genotipo con OVA en CFA el día 0 y recibieron una inmunización de refuerzo de TNP<sub>11</sub>-OVA en IFA el día 21. Para el análisis del suero, se obtuvo sangre por extracción retroorbital antes de la inmunización y los días 14 y 28 después de inmunización. Los isotipos de inmunoglobulinas específicos de TNP se detectaron por ELISA, usando TNP<sub>28</sub>-BSA como agente de captura y anticuerpos secundarios específicos de isotipo para la detección. Para la IgG1 específica de TNP, se usó un patrón disponible en el comercio. Para la IgG2a específica de TNP se usaron series de diluciones de un suero obtenido de un ratón inmunizado con TNP de un experimento previo, y los resultados se calcularon como se ha descrito antes. Las diluciones de muestra eran 1:31250 para la IgG1 y 1:1250 para la IgG2a.

*Respuestas humorales independientes de T:* Se inmunizaron grupos de 6 ratones por genotipo por vía intraperitoneal con 50  $\mu\text{g}$  de TNP<sub>1</sub>-LPS o 100  $\mu\text{g}$  de TNP<sub>2</sub>-AECM-Ficoll en PBS. Se recogió el suero 10 días después, y se analizó la IgM específica de TNP por ELISA, usando TNP<sub>28</sub>-BSA como un agente de captura y un anticuerpo secundario específico IgM para la detección. Se usó un anticuerpo IgM específico de TNP como patrón para el ELISA. Las diluciones de las muestras eran 1:1280 para Ficoll y 1:5120 para LPS.

### Resultados

*Deleción del gen IL-23p19.* Para determinar los efectos *in vivo* no repetitivos de la IL-23, se generaron ratones que eran deficientes en IL-23 pero competentes para producir IL-12. Se construyó un vector localizador en el que la región codificante entera de p19, que consistía en 4 exones, se sustituye por un gen indicador de GFP potenciado (eGFP), y un casete de resistencia a la neomicina (figura 6). La transmisión de la línea germinal se obtuvo de 2 clones de células ES correctamente localizados, 1c5 y 3h6, y la mutación se retrocruzó en el contenido de C57BL/6 usando congénicos de velocidad con 3 marcadores por cromosoma. Basándose en este análisis, solo se seleccionaron los ratones en los que la contaminación genética del contenido 129 era menor que 5% para los experimentos. El patrón de expresión de eGFP era comparable al del ARNm de p19 endógeno (no se muestran los datos).

*Los ratones IL-23p19<sup>-/-</sup> no tienen fenotipo abierto.* Como se esperaba del fenotipo de ratones doble deficientes IL-23/IL-12 IL12p40<sup>-/-</sup>, los animales IL-23p19<sup>-/-</sup> no presentaban ningún fenotipo abierto y nacieron con frecuencias mendelianas. No se encontraron anomalías en los órganos tras el examen histopatológico, y el análisis posterior de la química clínica y los parámetros hematológicos no pusieron de manifiesto diferencias entre los animales salvajes y genomanipulados. Además, los ratones IL-23p19<sup>-/-</sup> eran de tamaño y peso normales, y ambos sexos eran completamente fértiles. Los análisis por citometría de flujo de timocitos, esplenocitos y leucocitos de la sangre periférica con diferentes marcadores de superficie celular, no indicaron ninguna diferencia principal entre los animales salvajes y los IL-23p19<sup>-/-</sup> (tabla 2). Puesto que se sabe que IL-23 actúa en los linfocitos T de memoria, se determinó la relación de las células de memoria (CD44<sup>alto</sup> CD62L<sup>-</sup>) frente a indiferenciadas (CD62L<sup>+</sup>) de cada subconjunto, pero no se

## ES 2 329 673 T3

encontraron diferencias entre los ratones salvajes y los IL-23p19<sup>-/-</sup>. En todo el análisis, la única diferencia apreciable entre los dos genotipos consiste en una ligera preferencia de las subpoblaciones de células dendríticas hacia un fenotipo CD8<sup>+</sup>. Aunque el efecto era minoritario, alcanzó una diferencia estadística debido a la falta de datos, y podía ser compatible con observaciones recientes de que la IL-23 tiene efectos en las células presentadoras de antígenos. En resumen, no parece que la IL-23 sea necesaria para el desarrollo normal, y la introducción de un casete de eGFP no tiene un efecto tóxico en ningún tipo de célula ensayada.

TABLA 2

Timo	salvaje	genomanipulado	P(dif.)
CD4+	5,7 +/- 0,5	5,5 +/- 0,0	0,504
CD8+	3,3 +/- 0,1	3,1 +/- 0,3	0,397
DN	25,0 +/- 4,2	17,0 +/- 8,0	0,202
DP	65,9 +/- 3,7	74,3 +/- 8,0	0,174
Bazo	salvaje	genomanipulado	P(dif.)
CD4+	24,3 +/- 0,8	22,5 +/- 2,7	0,342
% diferenciados	69,0 +/- 1,3	67,5 +/- 2,1	0,090
% memoria	29,1 +/- 1,2	31,0 +/- 1,9	0,029
CD8+	15,2 +/- 1,2	12,3 +/- 2,0	0,101
% diferenciados	64,1 +/- 5,4	67,0 +/- 2,8	0,199
% memoria	18,1 +/- 1,8	18,3 +/- 1,4	0,084
I-A(b)+/CD11c+	2,0 +/- 0,2	2,2 +/- 0,2	0,041
%CD8+	12,8 +/- 0,9	16,3 +/- 1,7	0,000
%CD8-	87,2 +/- 0,9	83,6 +/- 1,8	0,000
CD19+	52,4 +/- 2,0	55,2 +/- 6,5	0,512
B220+	52,0 +/- 2,0	55,5 +/- 5,3	0,360
NK1,1 +	3,2 +/- 0,1	2,8 +/- 0,1	0,055
Sangre periférica			
	salvaje	genomanipulado	P(dif.)
CD3+	47,9 +/- 2,6	44,9 +/- 3,6	0,053
CD4+	28,2 +/- 2,3	26,9 +/- 2,5	0,270
CD8+	16,5 +/- 0,8	15,6 +/- 1,7	0,150
CD19+	43,2 +/- 3,2	45,2 +/- 3,6	0,215
B220+	44,9 +/- 3,5	46,4 +/- 4,8	0,466
DX5+	9,9 +/- 3,0	9,7 +/- 5,0	0,929
CD16+	8,0 +/- 0,9	8,6 +/- 1,5	0,302
I-A(b) +	44,0 +/- 1,9	45,4 +/- 4,9	0,428

*Respuestas inmunitarias humorales en ratones IL23p19<sup>-/-</sup>.* Para determinar la función de la IL-23 en la generación de una respuesta inmunitaria humoral, primero se midieron los niveles totales de inmunoglobulina de todos los isotipos en el suero de 16 ratones de cualquier genotipo. No había diferencia estadísticamente significativa entre el ratón de salvaje y el IL-23p19<sup>-/-</sup> (Figura 7), indicando que la IL-23 no es críticamente necesaria para el mantenimiento de los niveles normales de inmunoglobulina. Después, se ensayó si la IL-23 está implicada en la generación de una respuesta humoral dependiente de T contra un antígeno proteínico suministrado en adyuvante. Para este fin, se inmunizaron gru-

pos de 7 ratones, cada uno con ovalbúmina (OVA) y se ensayaron los isotipos de inmunoglobulina específicos de OVA en presuero (todos negativos, no se muestran los datos), y después de cada una de las dos inmunizaciones consecutivas (figura 8). Después de la inmunización principal, ninguno de los grupos difería de otro de forma significativa para las IgG1, IgG2b, IgG3 e IgE específicas para OVA. Sin embargo, se observaron niveles significativamente reducidos de IgG2a e IgA específica de OVA en animales IL-23p19<sup>-/-</sup> e IL-12p40<sup>-/-</sup> después de la inmunización principal. Como se esperaba, los niveles de todos los isotipos aumentaron espectacularmente después de la segunda inmunización. En este punto, tanto los ratones IL-23p19<sup>-/-</sup> como los IL-12p40<sup>-/-</sup> presentaban una notable reducción de todos los isotipos ensayados. La diferencia entre estos dos genotipos en general no era significativa, indicando que la IL-12 endógena no tenía una función principal en la respuesta humoral en ausencia de IL-23.

Puesto que la respuesta inmunitaria humoral depende de la función adecuada tanto de los linfocitos B como T, los autores de la invención buscaron después determinar por que mecanismo ejerce sus efectos estimuladores la IL-23. Para ensayar si la función de los linfocitos T está directamente afectada por la carencia de IL-23, los autores de la invención ensayaron la capacidad de los ratones deficientes en IL-23 para montar respuestas de linfocitos B contra antígenos independientes de T (TI). El antígeno TI-1 trinitrofenil-(TNP)-LPS conduce a la activación de linfocitos B a través de CD14 y TLR4, mientras que el antígeno TI-2 TNP-Ficoll activa los linfocitos B a través de agrupamiento de los receptores de linfocitos B de superficie. Los ratones IL-23p19<sup>-/-</sup> montaron respuestas de linfocitos B normales contra ambos tipos de antígenos (Figura 9) indicando que la IL-23 no tiene una función en las respuestas de linfocitos B independientes de T. Además, los linfocitos B de los ratones IL-23p19<sup>-/-</sup> proliferaron normalmente *in vitro* en respuesta a LPS, anti-IgM y anti-CD40 y dieron el cambio de isotipo normal en respuesta a IL-4 (no se muestra). La estimulación con IL-23 de los linfocitos B no condujo a un aumento de la proliferación o cambio de isotipo (no se muestra), y por lo tanto se concluyó que la IL-23 no afecta directamente a la función de los linfocitos B.

Debido a que la respuesta inmunitaria humoral estaba principalmente comprometida en la etapa de la inmunización secundaria, y debido a que la función de los linfocitos B aparecía normal en ratones IL-23p19<sup>-/-</sup>, los autores de la invención plantearon la hipótesis de que la reactivación ineficaz de los linfocitos T auxiliares específicos de antígeno podía causar el fenotipo. Para abordar esta cuestión más directamente, inmunizaron grupos de 5-6 ratones con OVA el día 0, seguido de una inmunización secundaria con OVA conjugada con TNP el día 14. Usando este régimen de inmunización, se reactivan los linfocitos T de memoria específicos para OVA por la inmunización secundaria, pero se activa un conjunto nuevo de linfocitos B con especificidad para TNP solo en el segundo punto de tiempo secundario. Por lo tanto, el subconjunto de linfocitos B de memoria específicos para OVA no contribuye a la formación de las inmunoglobulinas específicas para TNP. Siete días después del refuerzo, se ensayaron IgG1 e IgG2a específicas de TNP en el suero, y se encontró que se habían reducido significativamente ambos isotipos en los ratones IL-23p19<sup>-/-</sup> (figuras 10A, b). Este resultado subraya además la importancia de la IL-23 en las respuestas de los linfocitos B dependientes de T.

*Respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado (HTR) en ratones IL-23p19<sup>-/-</sup>.* Para investigar más la función de las células CD4<sup>+</sup> de memoria en los ratones IL-23p19<sup>-/-</sup>, se evaluó la capacidad de estos animales para montar las respuestas de HTR. Las respuestas de HTR son fuertemente dependientes de los linfocitos T y se publicó que eran defectuosas en ratones IL12p40<sup>-/-</sup>, pero aparecían normales en ratones que carecían de IL-12p35, sugiriendo que podían estar mediadas por la IL-23. Para abordar esta cuestión, los autores de la invención sensibilizaron grupos de 6 animales salvajes, IL-23p19<sup>-/-</sup> y IL-12p40<sup>-/-</sup> cada uno con BSA metilado (mBSA) en adyuvante completo de Freund (CFA) y provocaron respuestas de HTR 7 días después por inyección de mBSA en las patas. Para controlar el hinchamiento no específico, también se estimuló un grupo de ratones salvajes que no se habían sensibilizado. El hinchamiento de las patas específico se midió 18, 42 y 66 horas después de la estimulación, y se encontró que se inhibía en un grado similar tanto en los ratones IL-12p40<sup>-/-</sup> como en los IL-23p19<sup>-/-</sup> comparado con los ratones salvajes (figura 11). Las cinéticas también eran similares, tanto los ratones IL-12p40<sup>-/-</sup> como los IL-23p19<sup>-/-</sup> mostraban un hinchamiento muy reducido en los puntos de tiempo de 42 y 66, pero no en el de 18 horas. Por lo tanto, la IL-23 es un mediador principal de las respuestas de HTR, y la carencia de IL-23 conduce a respuestas ineficaces por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de memoria.

*Capacidad de las células dendríticas de IL-23p19<sup>-/-</sup> para estimular linfocitos T.* Para descartar la posibilidad de que los defectos observados en ratones IL-23p19<sup>-/-</sup> se debieran a la sensibilización ineficaz de linfocitos T por células presentadoras de antígeno deficientes en IL-23, se investigó después el potencial de DC IL-23p19<sup>-/-</sup> para estimular linfocitos T CD4<sup>+</sup> indiferenciados alotípicos aislados de bazo de ratones *balb/c*. En ausencia de DC, estos linfocitos T no proliferaban ni segregaban cantidades apreciables de citoquinas (figura 12A). La adición de DC a cualquiera de los genotipos dio como resultado la proliferación y producción consistentes de IL-2 en ambos genotipos. Puesto que se ha demostrado previamente que IL-23 es un potente inductor de IL-17, después se indujo la producción de IL-23 por DC usando lipopeptidos bacterianos, un potente agonista del receptor-de tipo Toll (TLR)-2 e inductor de la producción de IL-23. En estas condiciones, las DC salvajes indujeron potentemente la producción de IL-17 por los linfocitos T (figura 12A, panel inferior), mientras que los linfocitos T estimulados con DC de IL-23p19<sup>-/-</sup> produjeron significativamente menos IL-17. Para confirmar estas observaciones en un marco más fisiológico, después se provocaron respuestas de linfocitos T *in vivo* mediante inmunización de grupos de 8 ratones con hemocianina de lapa de California (KLH) en adyuvante completo de Freund (CFA). Se recogió el drenaje de las células de los nódulos linfáticos (LNC) 5 días después y se volvieron a estimular con KLH *in vitro*. Se observó otra vez que las LNC recogidas de los ratones IL-23p19<sup>-/-</sup> producían significativamente menos IL-17 (figura 12B, panel inferior). La proliferación de LNC era comparable en ambos genotipos (figura 12B, panel superior), indicando que tanto los ratones salvajes como los IL-23p19<sup>-/-</sup> montaron respuestas de linfocitos T consistentes contra el antígeno. Por lo tanto, la deficiencia de IL-23

no dificulta demasiado el potencial estimulador de las células dendríticas, sino que da como resultado la producción atenuada de IL-17 por los linfocitos T.

#### Discusión

5

Usando ratones deficientes en IL-23p19, se evaluaron las funciones *in vivo* no repetitivas de la IL-23, y se encontró que la deficiencia de IL-23 da como resultado respuestas inmunitarias dependientes de linfocitos T comprometidas, tales como respuestas inmunitarias humorales y reacciones de HRT.

10

Se observaron respuestas inmunitarias humorales profundamente reducidas en los ratones IL-23p19<sup>-/-</sup>, que afectaban a todos los isotipos de inmunoglobulinas. En paralelo, se inhibieron las respuestas de los ratones IL-12p40<sup>-/-</sup> en un grado similar o ligeramente mayor. Los resultados de los autores de la invención apoyan la conclusión de que la IL-23 es absolutamente necesaria para una respuesta humoral eficaz, aunque sigue sin determinarse, por el uso de ratones IL-12p35<sup>-/-</sup>, mientras que la IL-23 es suficiente para respuestas humorales normales en ausencia de IL-12.

15

En resumen, los ratones IL23p19<sup>-/-</sup> tienen respuestas de linfocitos T *in vivo* atenuadas que se ponen de manifiesto en la HTR y las respuestas inmunitarias humorales, y fenotípicamente se parecen a los ratones deficientes en IL-17. Los resultados de los autores de la invención indican que la administración clínica de la IL-23 o sus agonistas puede ser beneficiosa para soportar la función de linfocitos T en regímenes de inmunización y en pacientes inmunocomprometidos.

20

#### Referencias citadas en la descripción

25

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

#### Documentos de patente citados en la descripción

30

- US 4816567 A [0015] [0044] [0044] [0047]

- US 5545807 A [0048]

35

- US 5545806 A [0048]

- US 5569825 A [0048]

- US 5625126 A [0048]

40

- US 5633425 A [0048]

- US 5661016 A [0048]

45

- US 4676980 A [0052]

- WO 9100360 A [0052]

- WO 92200373 A [0052]

50

- US 3773919 A [0066]

#### Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

55

- S. Aggarwal; A. L. Gurney. *J Leukoc Biol*, 2002, vol. 71, 1 [0002]

- Z. Yao *et al. Immunity*, 1995, vol. 3, 811 [0002]

- J. Kennedy *et al. J Interferon Cytokine Res*, 1996, vol. 16, 611 [0002]

60

- F. Fossiez *et al. J Exp Med*, 1996, vol. 183, 2593 [0002]

- A. Linden; H. Hoshino; M. Laan. *Eur Respir J*, 2000, vol. 15, 973 [0002].

65

- X. Y. Cai; C. P. Gommoll, Jr.; L. Justice; S. K. Narula; J. S. Fine. *Immunol Lett*, 1998, vol. 62, 51 [0002]

- D. V. Jovanovic *et al. J Immunol*, 1998, vol. 160, 3513 [0002]

## ES 2 329 673 T3

- M. Laan *et al. J Immunol*, 1999, vol. 162, 2347 [0002]
- M. Chabaud; F. Fossiez; J. L. Taupin; P. Miossec. *J Immunol*, 1998, vol. 161, 409 [0003]
- 5 • S. Kotake *et al. J Clin Invest*, 1999, vol. 103, 1345 [0003]
- M. Chabaud *et al. Arthritis Rheum*, 1999, vol. 42, 963 [0003]
- M. A. Antonysamy *et al. Transplant Proc*, 1999, 31 [0003]
- 10 • M. A. Antonysamy *et al. J Immunol*, 1999, vol. 162, 577 [0003]
- C. C. Loong; C. Y. Lin; W. Y. Lui. *Transplant Proc*, 2000, 32 [0003]
- 15 • H. G. Hsieh; C. C. Loong; W. Y. Lui; A. Chen; C. Y. Lin. *Transpl Int*, 2001, vol. 14, 287 [0003]
- K. Kurasawa *et al. Arthritis Rheum*, 2000, vol. 43, 2455 [0003]
- C. Albanesi *et al. J Invest Dermatol*, 2000, vol. 115, 81 [0003]
- 20 • B. Homey *et al. J Immunol*, 2000, vol. 164, 6621 [0003]
- B. Oppmann *et al. Immunity*, 2000, vol. 13, 715 [0004]
- 25 • D. M. Frucht. *Sci STKE*, January 2002, vol. 114, PE1 [0004]
- M. T. Wiekowski *et al. J Immunol*, 2001, vol. 166, 7563 [0004]
- Benson *et al. FASEB*, 2002, vol. 16 (5 [0006]
- 30 • Warzocha; Wotowiec. Antisense strategy: biological utility and prospects in the treatment of hematological malignancies. *Leuk. Lymphoma*, 1997, vol. 24, 267-281 [0014]
- Morrison *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0015]
- 35 • Jones *et al. Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0015] [0046] [0047]
- Reichmann *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0015]
- 40 • Zapata *et al. Protein Eng.*, 1995, vol. 8 (10), 1057-1062 [0016]
- Sambrook *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989 [0025]
- Oligonucleotide Synthesis. 1984 [0025]
- 45 • Animal Cell Culture. 1987 [0025]
- Methods in Enzymology. Academic Press, Inc, [0025]
- 50 • Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Science Inc, 1987 [0025]
- Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells. 1987 [0025]
- Current Protocols in Molecular Biology. 1987 [0025]
- 55 • PCR: The Polymerase Chain Reaction. 1994 [0025]
- Current Protocols in Immunology. 1991 [0025]
- 60 • EMBL database. AF301620 [0030]
- GenBank. AF301620 [0030]
- Fields; Song. *Nature* (London), 1989, vol. 340, 245-246 [0032]
- 65 • Chien *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 9578-9582 [0032]
- Chevray; Nathans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 89, 5789-5793 [0032]

## ES 2 329 673 T3

- **Parham et al.** *J Immunol*, 2002, vol. 168, 5699-5798 [0037]
- **Kohler; Milstein.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0038]
- 5 • **Goding.** *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press*, 1986, 59-103 [0039]
- **Kozbor.** *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0040]
- 10 • **Brodeur et al.** *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. Marcel Dekker, Inc*, 1987, 51-63 [0040]
- **Munson; Pollard.** *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0041]
- **Reechmann et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0046]
- 15 • **Presta.** *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0046]
- **Riechmann et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0047]
- 20 • **Verhoeyen et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0047]
- **Hoogenboom; Winter.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0048]
- **Marks et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0048]
- 25 • **Cole et al.** *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. Alan R. Liss*, 1985, 77 [0048]
- **Boerner et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0048]
- 30 • **Marks et al.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0048]
- **Lonberg et al.** *Nature*, 1994, vol. 368, 856-859 [0048]
- **Morrison.** *Nature*, 1994, vol. 368, 812-13 [0048]
- 35 • **Fishwild et al.** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-51 [0048]
- **Neuberger.** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 826 [0048]
- 40 • **Lonberg; Huszar.** *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0048]
- **Mendez et al.** *Nature Genetics*, 1997, vol. 15, 146-156 [0049]
- **McCafferty et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-553 [0050]
- 45 • **Johnson, Kevin S.; Chiswell, David J.** *Current Opinion in Structural Biology*, 1993, vol. 3, 564-571 [0050]
- **Clackson et al.** *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0050]
- 50 • **Marks et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0050]
- **Griffith et al.** *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0050]
- **Marks et al.** *Bio/Technol.*, 1992, vol. 10, 779-783 [0050]
- 55 • **Waterhouse et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0050]
- **Morimoto et al.** *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1992, vol. 24, 107-117 [0051]
- 60 • **Brennan et al.** *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0051]
- **Carter et al.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0051]
- **Goding, J.W.** *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, Inc*, 1996 [0053]
- 65 • **Liddell.** *Weeks: Antibody Technology: A Comprehensive Overview. Bios Scientific Publishers*, 1995
- **Breitling; Dubel.** *Recombinant Antibodies. John Wiley & Sons*, 1999 [0053]

## ES 2 329 673 T3

- Phage Display: A Laboratory Manual. *Cold Springs Harbor Laboratory*, 2001 [0053]
- **Kotake et al.** *J. Clin. Invest.*, 1999, vol. 103, 1345 [0054]
- 5 • **Hamzaoui et al.** *Scand. J. Rheumatol.*, 2002, vol. 31 (4), 205-10 [0055]
- **Molet et al.** *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001, vol. 108 1 (3), 430-8 [0056]
- 10 • **Wong et al.** *Clin. Exp. Immunol.*, 2001, vol. 125 (2), 177-83 [0056]
- **Wong et al.** *Lupus*, 2000, vol. 9 (8), 589-93 [0057]
- **Homey et al.** *J. Immunol.*, 2000, vol. 164 (12), 6621-32 [0058]
- 15 • **Matusevicius et al.** *Mult. Scler.*, 1999, vol. 5 (2), 101-4 [0059]
- **Marasco et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 7889-7893 [0063]
- **R. C. Budd et al.** *J Immunol*, 1987, vol. 138, 3120 [0080]
- 20 • **T. M. Jung; W. M. Gallatin; I. L. Weissman; M. O. Dailey.** *J Immunol*, 1988, vol. 141, 4110 [0080]
- **Wu et al.** *J Immunol*, 2000, vol. 165, 6221 [0083]
- 25 • **A. O. Chua; V. L. Wilkinson; D. H. Presky; U. Gubler.** *J Immunol*, 1995, vol. 155, 4286 [0083]
- **Decken et al.** *Infect Immun.*, 2002, vol. 66, 4994-5000 [0085]
- **Cooper et al.** *J. Immunol*, 2002, vol. 168, 1322-1327 [0085]
- 30 • **Elkins et al.** *Infection & Immunity*, 2001, vol. 70, 1936-1948 [0085]
- **Holscher et al.** *J. Immunol*, vol. 167, 6957-6966 [0085]
- 35 • **Huang et al.** *Science*, 1993, vol. 259, 1742 [0090].

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un antagonista de la interleuquina-23 (IL-23) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto mamífero, en el que se ha determinado un nivel elevado de expresión de interleuquina-17 (IL-17) comparado con un sujeto sano, en el que dicho antagonista es un anticuerpo anti-IL-23 o un anti-receptor de IL-23.
- 10 2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho sujeto mamífero es un ser humano.
- 15 3. Uso según la reivindicación 2, en el que dicha enfermedad inflamatoria se selecciona de inflamación crónica, diabetes autoinmune, artritis reumatoide (AR), *espondilitis reumatoide*, artritis gotosa y otras afecciones artríticas, esclerosis múltiple (EM), asma, lupus eritematoso sistémico, síndrome de dificultad respiratoria en el adulto, enfermedad de Behcet, psoriasis, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, reacción de injerto contra huésped, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Alzheimer y piresis.
- 20 4. Uso según la reivindicación 3, en el que dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria crónica.
5. Uso según la reivindicación 4, en el que dicha enfermedad inflamatoria crónica se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide (AR), reacción de injerto contra huésped, esclerosis múltiple (EM) y psoriasis.
- 25 6. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.
7. Uso según la reivindicación 6, en el que dicho fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>.
- 30 8. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.
9. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es quimérico.
- 35 10. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es humanizado.
11. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es humano.
- 40 12. Uso según la reivindicación 2, en el que dicho medicamento es para administrar en combinación con un agente terapéutico adicional.
13. Uso según la reivindicación 12, en el que dicho agente terapéutico adicional es una molécula antiinflamatoria.
- 45 14. Uso según la reivindicación 13, en el que dicha molécula antiinflamatoria se selecciona del grupo que consiste en corticosteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE).
15. Procedimiento para identificar un agente antiinflamatorio, que comprende las etapas de:
- 50 (a) incubar un cultivo de linfocitos T de memoria con IL-23, en presencia y ausencia de una molécula candidato;
- (b) hacer el seguimiento del nivel de IL-17 en dicho cultivo; y
- (c) identificar dicha molécula candidato como un agente antiinflamatorio si el nivel de IL-17 es menor en presencia que en ausencia de dicha molécula candidato.
- 55 16. Procedimiento de la reivindicación 15, en el que dicha molécula candidato es una molécula orgánica pequeña no peptídica.
17. Procedimiento de la reivindicación 15, en el que dicha molécula candidato es un péptido, un polipéptido o un anticuerpo.
- 60 18. Procedimiento de la reivindicación 15, en el que dichos linfocitos T de memoria son linfocitos T de memoria activados.
19. Procedimiento de la reivindicación 15, en el que el nivel de IL-17 se sigue por ELISA.
- 65 20. Antagonista de la interleuquina-23 (IL-23) para usar en un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria en un sujeto mamífero, en el que se ha determinado un nivel elevado de expresión de interleuquina-17 (IL-17) comparado con un sujeto sano, en el que dicho antagonista es un anticuerpo anti-IL-23 o un anti-receptor de IL-23.
21. Antagonista según la reivindicación 20, en el que dicho sujeto mamífero es un ser humano.

## ES 2 329 673 T3

22. Antagonista según la reivindicación 21, en el que dicha enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en inflamación crónica, diabetes autoinmune, artritis reumatoide (AR), *espondilitis reumatoide*, artritis gotosa y otras afecciones artríticas, esclerosis múltiple (EM), asma, lupus eritematoso sistémico, síndrome de dificultad respiratoria en el adulto, enfermedad de Behcet, psoriasis, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, reacción de injerto contra huésped, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Alzheimer y piresis.

23. Antagonista según la reivindicación 22, en el que dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria crónica.

24. Antagonista según la reivindicación 23, en el que dicha enfermedad inflamatoria crónica se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide (AR), reacción de injerto contra huésped, esclerosis múltiple (EM) y psoriasis.

25. Antagonista según la reivindicación 20, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

26. Antagonista según la reivindicación 25, en el que dicho fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>.

27. Antagonista según la reivindicación 20, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

28. Antagonista según la reivindicación 20, en el que dicho anticuerpo es quimérico.

29. Antagonista según la reivindicación 20, en el que dicho anticuerpo es humanizado.

30. Antagonista según la reivindicación 20, en el que dicho anticuerpo es humano.

31. Antagonista según la reivindicación 21, para administrar a un sujeto en combinación con un agente terapéutico adicional.

32. Antagonista según la reivindicación 31, en el que dicho agente terapéutico adicional es una molécula antiinflamatoria.

33. Antagonista según la reivindicación 32, en el que dicha molécula antiinflamatoria se selecciona del grupo que consiste en corticosteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

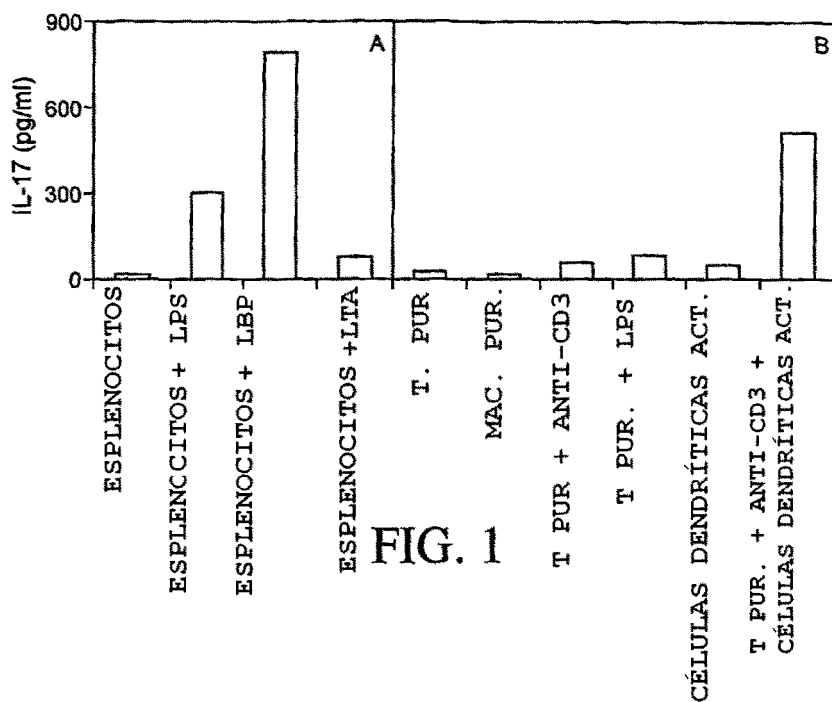


FIG. 1

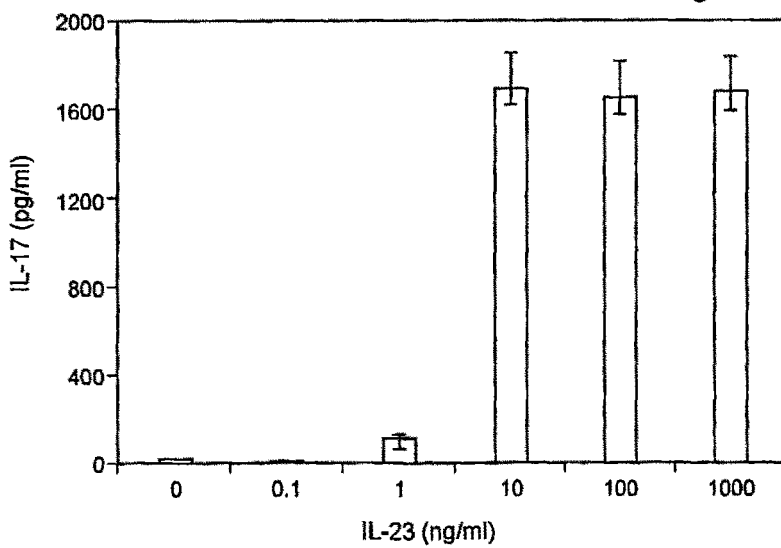


FIG. 2A

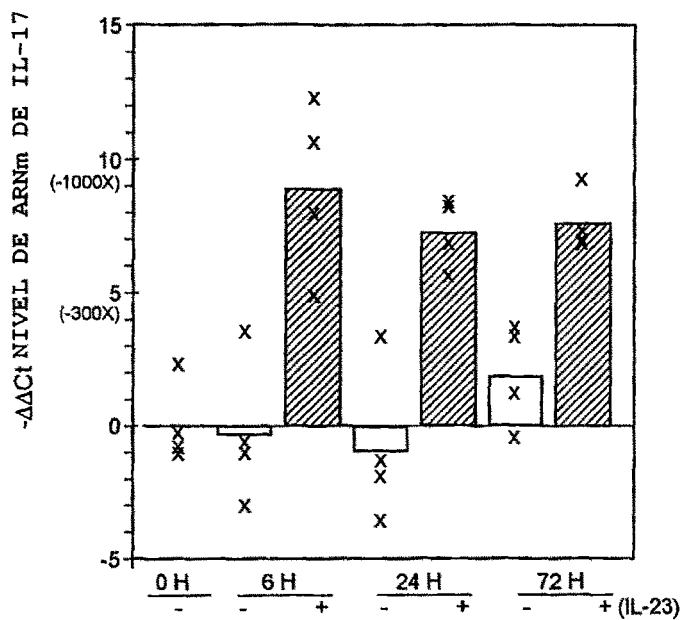


FIG. 2B

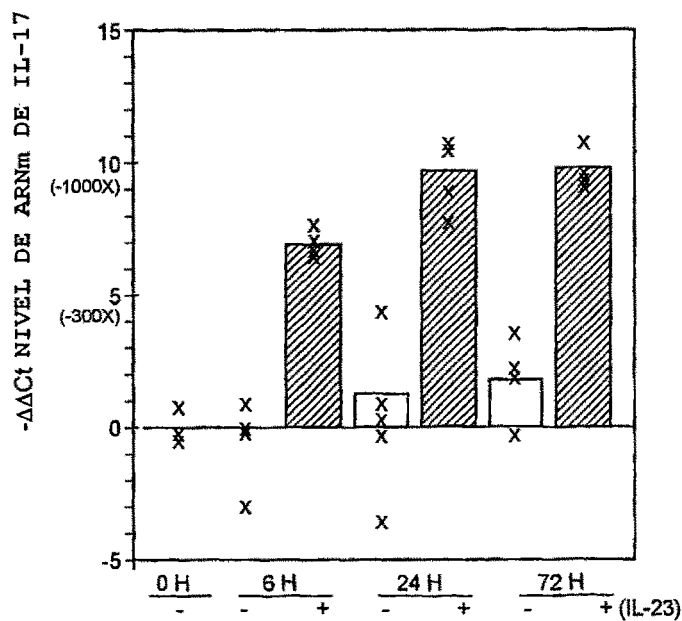


FIG. 2C

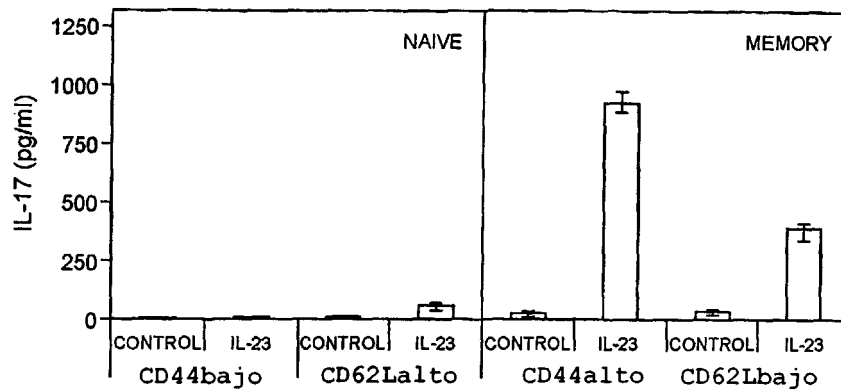


FIG. 3

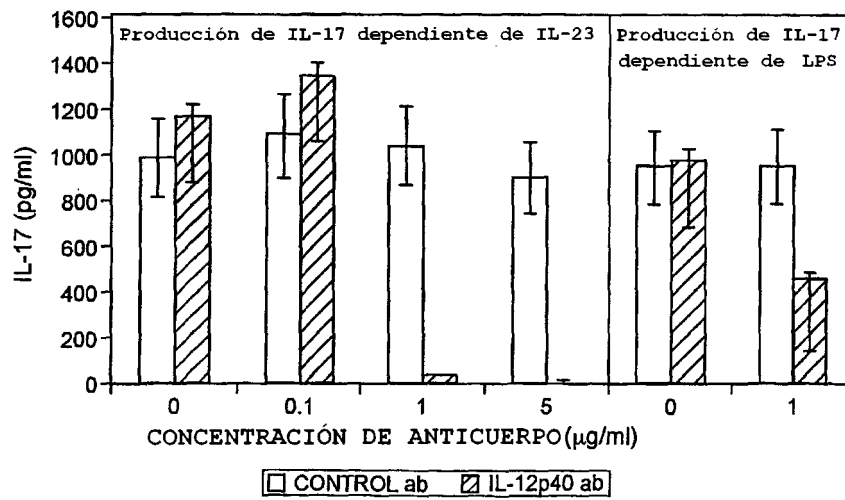


FIG. 4A

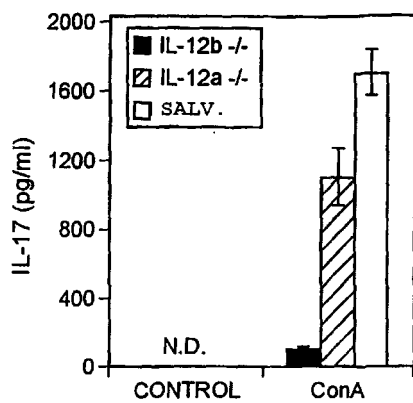


FIG. 4B

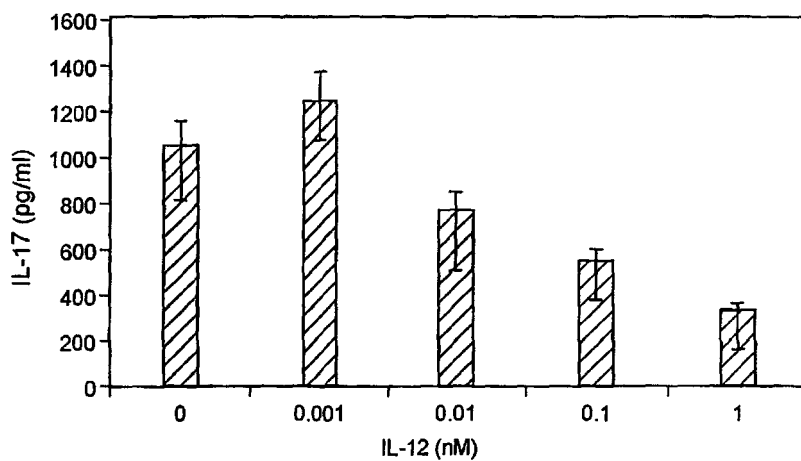


FIG. 5A

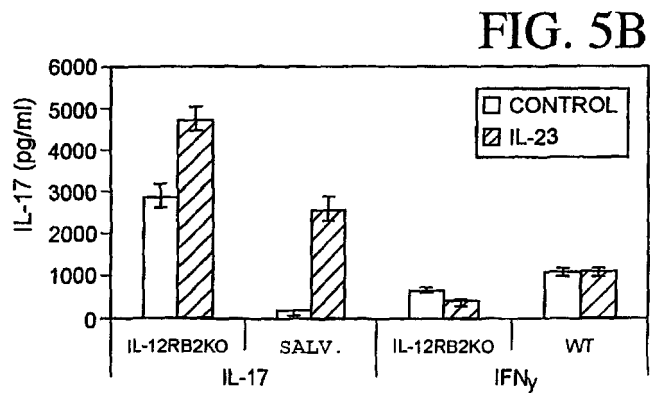


FIG. 5B

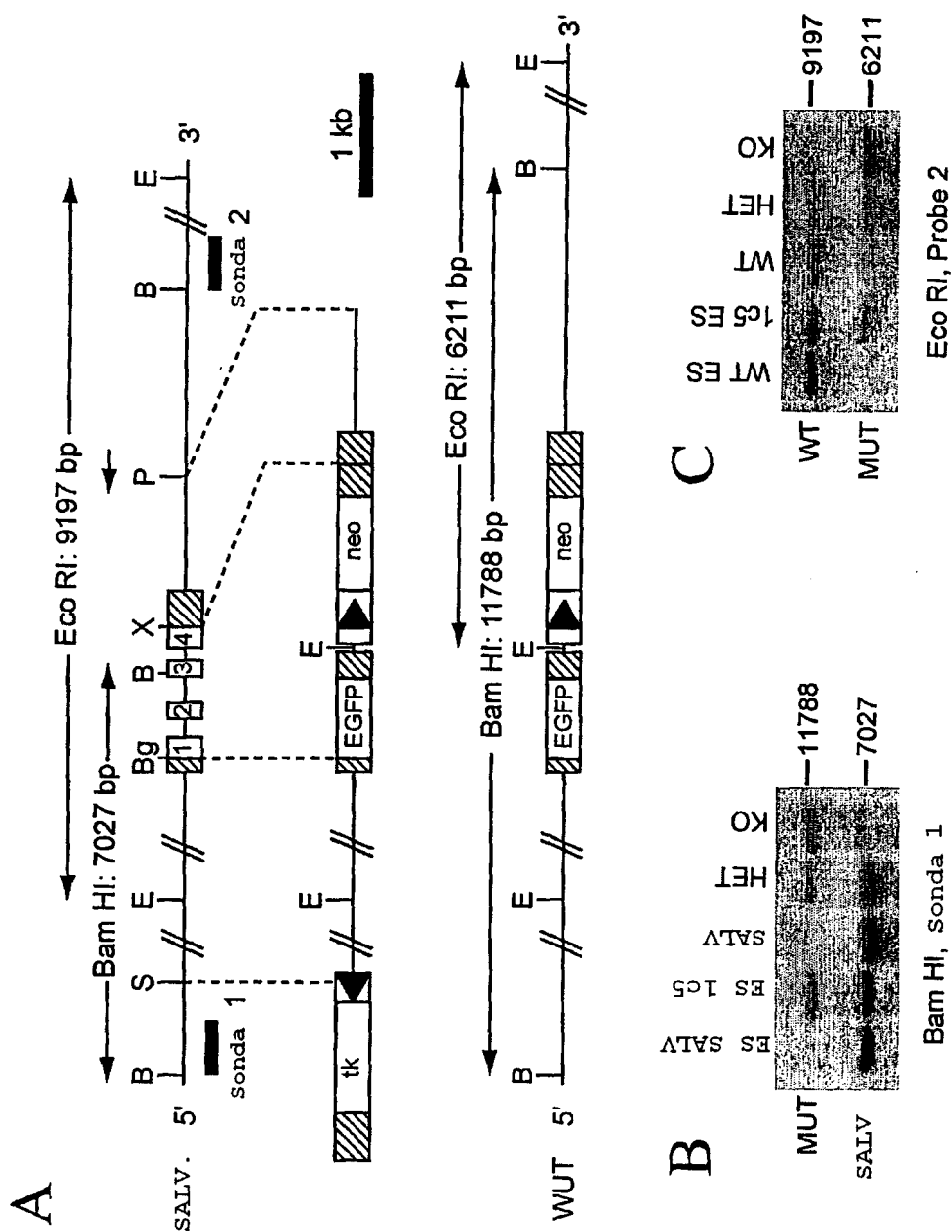
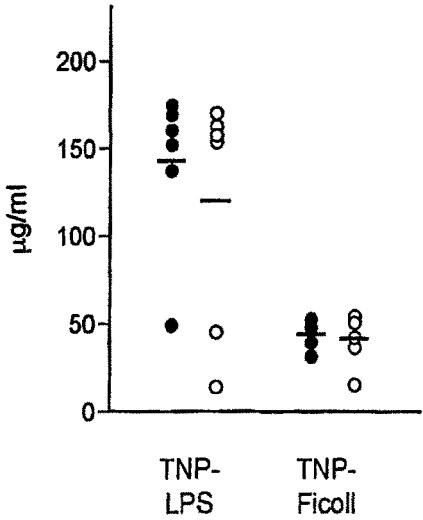
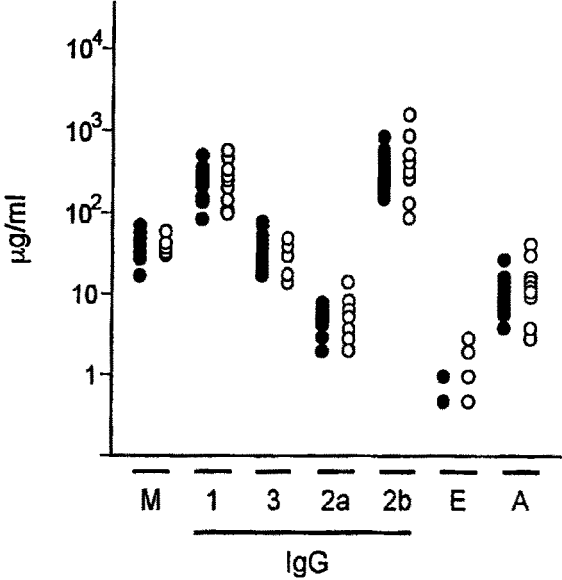
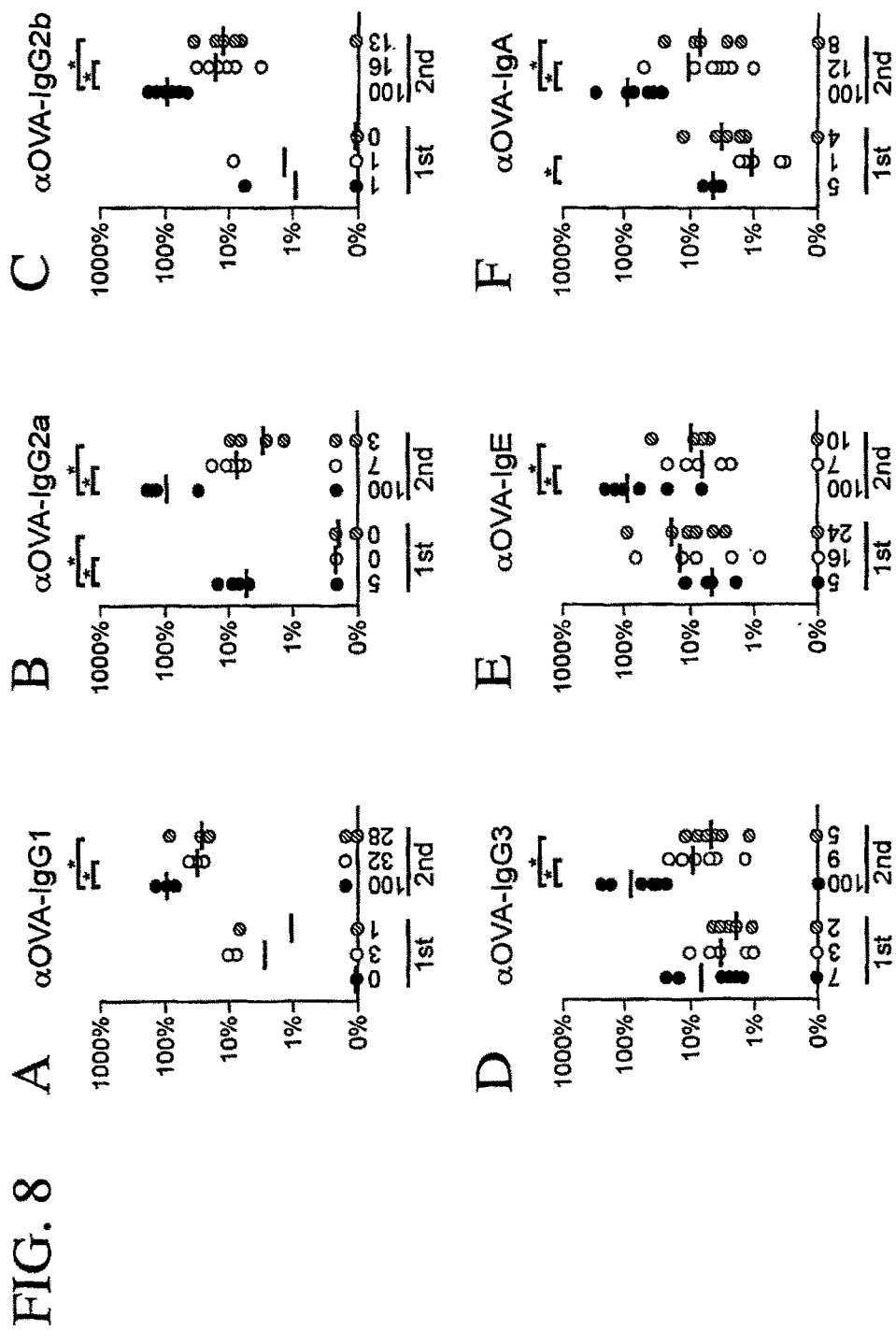


FIG. 6





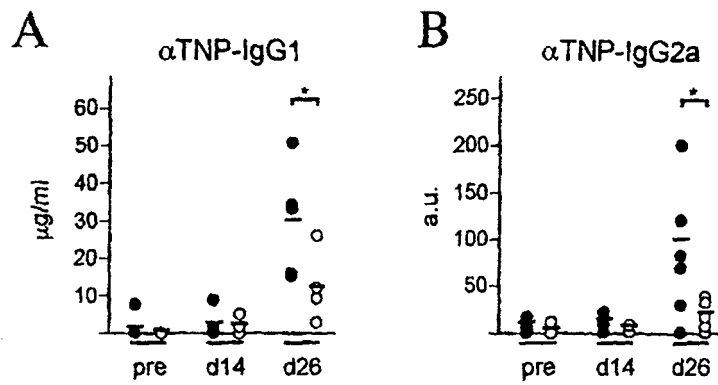


FIG. 10

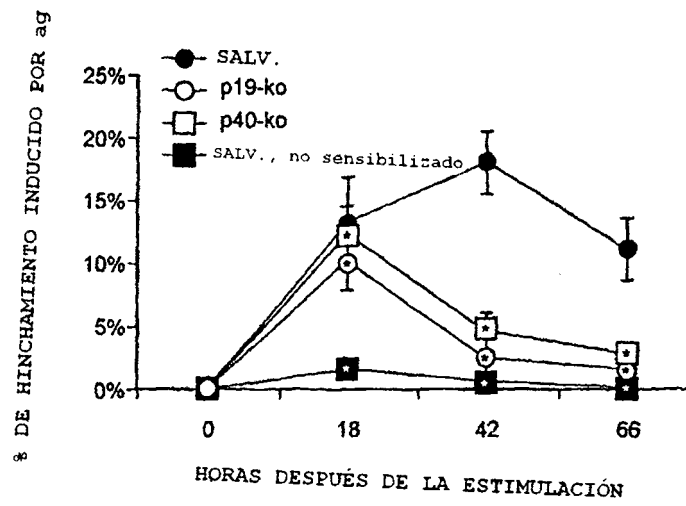


FIG. 11

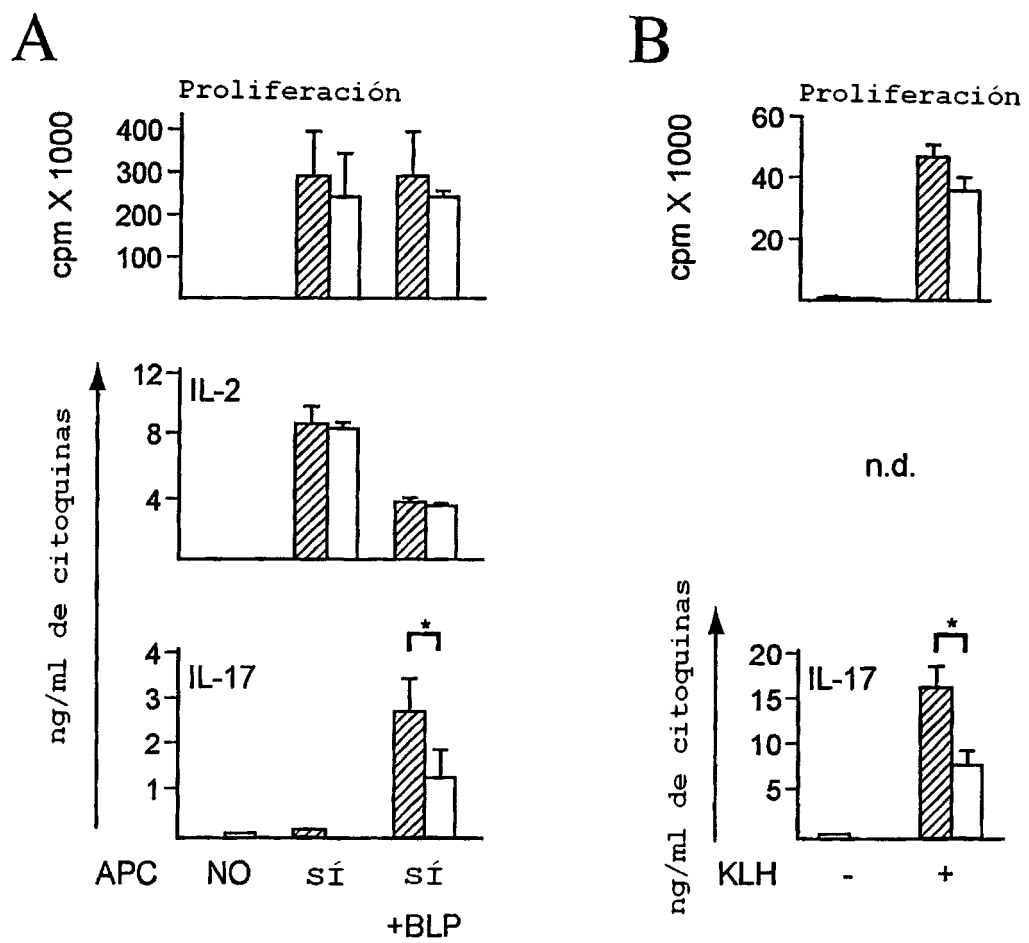


FIG. 12

# ES 2 329 673 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Gurney, Austin	
5	<120> INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-17	
	<130> 39766/0125	
	<140> desconocido	
	<141> 2003-10-30	
10	<150> 60/423.090	
	<151> 2002-10-30	
	<160> 8	
15	<170> FastSEQ para Windows versión 4.0	
	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<400> 1	
25	gcttggtggc ccacctatga t	21
	<210> 2	
	<211> 20	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<400> 2	
35	agaccctcaa agttcatgac	20
	<210> 3	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<400> 3	
	ctgacggcgc tttcttacc	20
50	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<400> 4	
60	tttgccagt gggatacacc	20
	<210> 5	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

## ES 2 329 673 T3

	<400> 5	
	aactgctggg gctgttacac	20
5	<210> 6	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<400> 6	
15	gcctgggctc actttttctg	20
	<210> 7	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<400> 7	
25	gcgtgaaggg caaggacacc	20
	<210> 8	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<400> 8	
	agggggagga ttgggaagac	20
40		
45		
50		
55		
60		
65		