

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 487 533**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2005 E 10175150 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2364729**

54 Título: **Anticuerpos antagonistas de IL-17**

30 Prioridad:

05.08.2004 GB 0417487

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

21.08.2014

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DI PADOVA, FRANCO E.;
GRAM, HERMANN;
HOFSTETTER, HANS;
JESCHKE, MARGIT;
RONDEAU, JEAN-MICHEL y
VAN DEN BERG, WIM**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 487 533 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos antagonistas de IL-17

5 Esta invención se relaciona con una molécula que se enlaza con IL-17, en particular un anticuerpo con IL-17 humana, más preferiblemente un anticuerpo humano con IL-17 humana (también llamada IL-17A) y con el uso de tales anticuerpos en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por IL-17, en particular soriasis.

10 La IL-17, una citoquina derivada de células T presente por ejemplo en artritis reumatoide (AR), actúa como una citoquina proinflamatoria, particularmente junto con IL-1 y TNF- α (Chabaud M & Miossec P (1999) Arthritis Rheum 42, 963 - 970; Awane M et al. (1999) J. Immunol 162, 5337 - 5344). La IL-17 induce la producción de MMP y subregula TIMP (Jovanovic DV et al. (2001) J. Rheumatol. 28, 712 - 718), y el bloqueo de IL-1 e IL-17 tiene un efecto sinérgico sobre la inflamación y la destrucción ósea in vivo (Chabaud M & Miossec (2001) Arthritis Rheum 44, 1293 - 1303). La producción excesiva o inapropiada de IL-17 se asocia con la patología de varias enfermedades y trastornos, tales como artritis reumatoide (Witowski et al., 2004 Cell Mol Life Sci 61: 567 - 579), osteoartritis, aflojamiento de los implantes óseos, rechazo agudo de trasplantes (Antonyssamy et al., 1999, J Immunol 162, 577 - 584; van Kooten et al., 1998, J Am Soc Nephrol 9, 1526 - 1534), septicemia, choque endotóxico o séptico, alergias, asma (Molet et al., 2001, J Allergy Clin Immunol 108, 430 - 438), pérdida de hueso, soriasis (Teunissen et al., 1998, J Invest Dermatol 111, 645 - 649), isquemia, esclerosis sistémica (Kurasawa et al., 2000, Arthritis Rheum 43, 2455 - 2463), apoplejía, y otros trastornos inflamatorios. Se han propuesto anticuerpos para la IL-17 para uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por la IL-17; véase por ejemplo, WO 95/18826 y la discusión en la introducción de la misma.

25 Ahora hemos preparado anticuerpos mejorados para la IL-17 humana adecuados para uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por la IL-17.

30 Por lo tanto, la invención proporciona un anticuerpo que se enlaza con IL-17 o un fragmento del mismo que comprende tanto los dominios variables de cadena ligera (V_L) como los de cadena pesada (V_H); donde dicho anticuerpo que se enlaza con IL-17 o un fragmento del mismo comprende por lo menos un sitio de enlazamiento con el antígeno que comprende:

35 a) un V_H que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, teniendo dicha CDR1 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, teniendo dicha CDR2 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y teniendo dicha CDR3 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde dichas regiones hipervariables están de acuerdo con la definición de Kabat; o un V_H que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1-x, CDR2-x y CDR3-x, teniendo dicha CDR1-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, teniendo dicha CDR2-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 y teniendo dicha CDR3-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, en donde dichas regiones hipervariables están de acuerdo con la definición de Chothia; y

40 b) un V_L que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', teniendo dicha CDR1' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, teniendo dicha CDR2' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y teniendo dicha CDR3' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

45 La invención también proporciona, de acuerdo con la forma de realización anterior, un anticuerpo que se enlaza con IL-17 o un fragmento del mismo, que comprende por lo menos un sitio de enlazamiento con el antígeno que comprende ya sea:

50 a) un V_H que tiene una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 8;
b) un V_L que tiene una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 10; o
c) un V_H que tiene una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 8 y un V_L que tiene una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 10.

55 En otra forma de realización de la invención, la invención describe una molécula que se enlaza con IL-17 que comprende un sitio de enlazamiento del antígeno que comprende al menos un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1-x, CDR2-x y CDR3-x, teniendo dicha CDR1-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 (G-F-T-F-S-N-Y-W-M-N), teniendo dicha CDR2-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 (A-I-N-Q-D-G-S-E-K-Y-Y), y teniendo dicha CDR3-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 (C-V-R-D-Y-Y-D-I-L-T-D-Y-Y-I-H-Y-W-Y-F-D-L-W-G); o equivalentes directos de CDR-x de los mismos.

60 A menos que se indique otra cosa, se describe aquí cualquier cadena de polipéptidos que tiene una secuencia de aminoácidos que parte en el extremo del terminal N y que finaliza en el extremo del terminal C.

65 Cuando el sitio de enlazamiento del antígeno comprende tanto los dominios V_H como V_L , estos se pueden ubicar sobre la misma molécula de polipéptido o, preferiblemente, cada dominio puede estar en una cadena diferente, siendo el dominio V_H parte de una cadena pesada de inmunoglobulina o un fragmento de la misma y siendo el V_L parte de una cadena ligera de inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

Por molécula que se enlaza con IL-17" se entiende cualquier molécula capaz de enlazarse con el antígeno de IL-17 ya sea solo o asociado con otras moléculas. La reacción de enlazamiento se puede mostrar mediante métodos estándar (ensayos cualitativos) que incluyen, por ejemplo, un ensayo de enlazamiento, un ensayo de competición o un bioensayo para determinar la inhibición del enlazamiento de IL-17 a su receptor o cualquier clase de ensayo de enlazamiento, con referencia a una prueba de control negativa en la que se utiliza un anticuerpo de especificidad no relacionada pero del mismo isotipo, por ejemplo un anticuerpo anti-CD25 (véase también el Ejemplo 1).

Ejemplos de moléculas que se enlazan con antígeno incluyen anticuerpos como los producidos por células B o hibridomas y anticuerpos quiméricos, injertados en CDR o humanos o cualquier fragmento de los mismos, por ejemplo fragmentos F(ab')₂ y Fab, así como también anticuerpos de un solo dominio o de cadena sencilla.

Un anticuerpo de cadena sencilla consiste de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo enlazada en forma covalentemente mediante un enlazador peptídico que consiste usualmente de 10 a 30 aminoácidos, preferiblemente de 15 a 25 aminoácidos. Por lo tanto, tal estructura no incluye la parte constante de las cadenas pesada y ligera y se cree que el espaciador de péptido pequeño debe ser menos antigénico que una parte constante completa. Por "anticuerpo quimérico" se entiende un anticuerpo en el que las regiones constantes de cadenas pesada y ligera o ambas son de origen humano mientras que los dominios variables tanto de las cadenas pesada como ligera son de origen no humano (por ejemplo de murino) o de origen humano pero derivado de un anticuerpo humano diferente. Por "anticuerpo injertado en CDR" se entiende un anticuerpo en el que las regiones hipervariables (CDR) se derivan de un anticuerpo donante, tal como un anticuerpo no humano (por ejemplo de murino) o un anticuerpo humano diferente, mientras que todas o sustancialmente todas las otras partes de la inmunoglobulina, por ejemplo las regiones constantes y las partes altamente conservadas de los dominios variables, es decir las regiones estructurales, se derivan de un anticuerpo aceptor, por ejemplo un anticuerpo de origen humano. Sin embargo, un anticuerpo injertado en CDR puede contener unos pocos aminoácidos de la secuencia donante en las regiones estructurales, por ejemplo en las partes de las regiones estructurales adyacentes a las regiones hipervariables. Por "anticuerpo humano" se entiende un anticuerpo en el que las regiones constante y variable tanto de las cadenas pesada como ligera son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a las secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo e incluye los anticuerpos producidos por ratones en los que los genes de la parte constante y variable de la inmunoglobulina de murino se han reemplazado por sus contrapartes humanas, por ejemplo como se describe en términos generales en los documentos EP 0546073 B1, USP 5545806, USP 5569825, USP 5625126, USP 5633425, USP 5661016, USP 5770429, EP 0 438474 B1 y EP 0 463151 B1.

Los anticuerpos particularmente preferidos de la invención que se enlazan con IL-17 son anticuerpos humanos, especialmente el anticuerpo AIN457 como se describe aquí más adelante en los Ejemplos 1 y 2.

Por lo tanto, en los anticuerpos quiméricos preferidos, los dominios variables tanto de las cadenas pesada como ligera son de origen humano, por ejemplo aquellos del anticuerpo AIN457 que se muestran en la SEQ ID NO: 10 (= dominio variable de cadena ligera, es decir del aminoácido 1 al 109 de la SEQ ID NO: 10) y la SEQ ID NO: 8 (= dominio variable de cadena pesada, es decir del aminoácido 1 al 127 de la SEQ ID NO: 8). Los dominios de región constante también comprenden preferiblemente dominios de la región constante humana adecuada, por ejemplo como se describe en "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat E.A. et al., US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health.

Las regiones hipervariables se pueden asociar con cualquier clase de regiones estructurales, aunque preferiblemente son de origen humano. Las regiones estructurales adecuadas se describen en Kabat E.A. et al., igual que la referencia anterior. La estructura de cadena pesada preferida es una estructura de cadena pesada humana, por ejemplo aquella del anticuerpo AIN457. Esta consiste de la secuencia por ejemplo de las regiones FR1 (aminoácidos 1 a 30 de la SEQ ID NO: 8), FR2 (aminoácidos 36 a 49 de la SEQ ID NO: 8), FR3 (aminoácidos 67 a 98 de la SEQ ID NO: 8) y FR4 (aminoácidos 117 a 127 de la SEQ ID NO: 8). Tomando en consideración las regiones hipervariables determinadas de AIN457 mediante análisis de rayos X, otra estructura de cadena pesada preferida consiste en la secuencia de las regiones FR1-x (aminoácidos 1 a 25 de la SEQ ID NO: 8), FR2-x (aminoácidos 36 a 49 de la SEQ ID NO: 8), FR3-x (aminoácidos 61 a 95 de la SEQ ID NO: 8) y FR4 (aminoácidos 119 a 127 de la SEQ ID NO: 8). En una forma similar, la estructura de cadena ligera consiste, en secuencia, de las regiones FR1' (aminoácidos 1 a 23 de la SEQ ID NO: 10), FR2' (aminoácidos 36 a 50 de la SEQ ID NO: 10), FR3' (aminoácidos 58 a 89 de la SEQ ID NO: 10) y FR4' (aminoácidos 99 a 109 de la SEQ ID NO: 10).

Por lo tanto, la invención también describe una molécula que se enlaza con IL-17 que comprende por lo menos un sitio de enlazamiento del antígeno que comprende ya sea un primer dominio que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a aquella mostrada en la SEQ ID NO: 8 que inicia con el aminoácido en la posición 1 y termina con el aminoácido en la posición 127 o un primer dominio como se describió anteriormente y un segundo dominio que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a aquella mostrada en la SEQ ID NO: 10, que inicia con el aminoácido en la posición 1 y termina con el aminoácido en la posición 109.

Los anticuerpos monoclonales que surgen contra una proteína encontrada en forma natural en todos los humanos se desarrollan típicamente en un sistema no humano, por ejemplo en ratones, y como tales son proteínas típicamente no humanas. Como una consecuencia directa de esto, un anticuerpo xenogénico como el producido por un hibridoma, cuando se administra a los humanos, provoca una respuesta inmune indeseable que está mediada predominantemente por la parte constante de la inmunoglobulina xenogénica. Esto claramente limita el uso de tales anticuerpos ya que ellos no se pueden administrar durante un periodo de tiempo prolongado. Por lo tanto se prefiere utilizar particularmente anticuerpos de cadena sencilla, de un solo dominio, quiméricos, injertados en CDR, o especialmente humanos que probablemente no provocan una respuesta alogénica sustancial cuando se administran a los humanos.

En vista de lo anterior, se selecciona una molécula más preferida de la invención que se enlaza con IL-17 a partir de un anticuerpo anti IL-17 humano que comprende por lo menos

a) una cadena pesada de inmunoglobulina o un fragmento de la misma que comprende (i) un dominio variable que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3 (ii) la parte constante o fragmento de la misma de una cadena pesada humana; teniendo dicha CDR1 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, teniendo dicha CDR2 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y teniendo dicha CDR3 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y

b) una cadena ligera de inmunoglobulina o un fragmento de la misma que comprende (i) un dominio variable que comprende en secuencia las regiones hipervariables y opcionalmente también las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3' y (ii) la parte constante o un fragmento de la misma de una cadena ligera humana, teniendo dicha CDR1' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, teniendo dicha CDR2' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y teniendo dicha CDR3' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

Alternativamente, se puede seleccionar un anticuerpo que se enlaza con IL-17 a partir de una molécula de enlazamiento de cadena sencilla que comprende un sitio de enlazamiento del antígeno que comprende

a) un primer dominio que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, teniendo dicha CDR1 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, teniendo dicha CDR2 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y teniendo dicha CDR3 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; y

b) un segundo dominio que comprende las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', teniendo dicha CDR1' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, teniendo dicha CDR2' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y teniendo dicha CDR3' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; y

c) un enlazador peptídico que se enlaza ya sea al extremo del terminal N del primer dominio y al extremo del terminal C del segundo dominio o al extremo del terminal C del primer dominio y al extremo del terminal N del segundo dominio.

Como es bien sabido, los cambios menores en una secuencia de aminoácidos tales como supresión, adición o sustitución de uno, unos pocos o incluso varios aminoácidos puede conducir a una forma alélica de la proteína original que tiene propiedades sustancialmente idénticas.

Alternativamente, un anticuerpo que se enlaza con IL-17 de la invención se puede describir como una molécula que se enlaza con IL-17 que comprende al menos un sitio de enlazamiento del antígeno que comprende al menos un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que comprende en secuencia

a) regiones hipervariables CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 2) y CDR3 (SEQ ID NO: 3); o

b) regiones hipervariables CDR1_i, CDR2_i, CDR3_i, dicha región hipervariable CDR1_i difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR1 como se muestra en la SEQ ID NO: 1, dicha región hipervariable CDR2_i difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR2 como se muestra en la SEQ ID NO: 2; y dicha región hipervariable CDR3_i difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR3 como se muestra en la SEQ ID NO: 3; y

dicha molécula de enlazamiento con IL-17 que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1_x, CDR2_x, y CDR3_x es capaz de inhibir la actividad de IL-17 humana 1 nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20 nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula en un 50%, dicha actividad inhibitoria se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana.

De forma similar, un anticuerpo que se enlaza con IL-17 de la invención puede ser descrito como una molécula que se enlaza con IL-17 que comprende por lo menos un sitio de enlazamiento del antígeno que comprende por lo menos un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que comprende en secuencia

a) regiones hipervariables CDR1-x (SEQ ID NO: 11), CDR2-x (SEQ ID NO: 12) y CDR3-x (SEQ ID NO: 13); o

b) regiones hipervariables CDR1_{j-x}, CDR2_{j-x}, CDR3_{j-x}, dicha región hipervariable CDR1_{j-x} difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR1-x como se muestra en la SEQ ID NO: 11, dicha región hipervariable CDR2_{j-x} difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1

aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR2-x como se muestra en la SEQ ID NO: 12; y dicha región hipervariable CDR3j-x difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR3-x como se muestra en la SEQ ID NO: 13; y

5 dicha molécula que se enlaza con IL-17 que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1j-x, CDR2j-x, y CDR3j-x es capaz de inhibir la actividad de IL-17 humana 1 nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20 nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula en un 50%, dicha actividad inhibidora se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana.

10 De forma similar, un anticuerpo que se enlaza con IL-17 de la invención puede ser descrito como una molécula que se enlaza con IL-17 que comprende por lo menos un sitio de enlazamiento del antígeno que comprende por lo menos un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL) que comprende en secuencia

a) regiones hipervariables CDR'1 (SEQ ID NO: 4), CDR'2 (SEQ ID NO: 5) y CDR'3 (SEQ ID NO: 6); o
 15 b) regiones hipervariables CDR1'j, CDR2'j, CDR3'j, dicha región hipervariable CDR'1j difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR'1 como se muestra en la SEQ ID NO: 4, dicha región hipervariable CDR'2j difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR'2 como se muestra en la SEQ ID NO: 5; y dicha región hipervariable CDR'3j difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR'3 como se muestra en la
 20 SEQ ID NO: 6; y

dicha molécula que se enlaza con IL-17 comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR'1j, CDR'2j, y CDR'3j es capaz de inhibir la actividad de IL-17 humana 1 nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20 nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula en un 50%, dicha
 25 actividad inhibidora se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana.

Alternativamente, una molécula que se enlaza con IL-17 de la invención puede ser descrita como un anticuerpo que se enlaza con IL-17 que comprende tanto los dominios variables de cadena ligera (VL) como de cadena pesada (VH) y dicho anticuerpo que se enlaza con IL-17 comprende por lo menos un sitio de enlazamiento del antígeno que
 30 comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 2) y CDR3 (SEQ ID NO: 3); y
 un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL) que comprende en secuencia las regiones
 35 hipervariables CDR1' (SEQ ID NO: 4), CDR2' (SEQ ID NO: 5) y CDR3' (SEQ ID NO: 6); o
 b) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1j, CDR2j, y CDR3j, dicha región hipervariable de las regiones hipervariables COR1j, CDR2j, CDR3j, dicha región hipervariable CDR1j difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la
 40 región hipervariable de CDR1 como se muestra en la SEQ ID NO: 1, dicha región hipervariable CDR2j difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR2 como se muestra en la SEQ ID NO: 2; y dicha región hipervariable CDR3j difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR3 como se muestra en la SEQ ID NO: 3; y un dominio variable de
 45 cadena ligera de inmunoglobulina (VL) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1'j, CDR2'j, CDR3'j, dicha región hipervariable CDR'1j difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR'1 como se muestra en la SEQ ID NO: 4, dicha región hipervariable CDR'2j difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR'2 como se muestra en la
 50 SEQ ID NO: 5; y dicha región hipervariable CDR'3j difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR'3 como se muestra en la SEQ ID NO: 6; y
 dicha molécula que se enlaza con IL-17 definida en b) comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1j, CDR2j, CDR3j, CDR'1j, CDR'2j, y CDR'3j es capaz de inhibir la actividad de IL-17 humana 1 nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20 nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula en un 50%, dicha actividad inhibidora se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en
 fibroblastos de dermis humana.

55 Alternativamente, una molécula que se enlaza con IL-17 de la invención puede ser descrita como una molécula que se enlaza con IL-17 que comprende tanto los dominios variables de cadena ligera (VL) como de cadena pesada (VH) y dicha molécula que se enlaza con IL-17 comprende por lo menos un sitio de enlazamiento del antígeno que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1-x (SEQ ID NO: 11), CDR2-x (SEQ ID NO: 12) y CDR3-x (SEQ ID NO: 13); y
 un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1' (SEQ ID NO: 4), CDR2' (SEQ ID NO: 5) y CDR3' (SEQ ID NO: 6); o
 60 b) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1j-x, CDR2j-x, y CDR3j-x, dicha región hipervariable de las regiones hipervariables CDR1j-x,
 65

- 5 CDR2_j-x, CDR3_j-x, dicha región hipervariable CDR1_j-x difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR1-x como se muestra en la SEQ ID NO: 11, dicha región hipervariable CDR2_j-x difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR2-x como se muestra en la SEQ ID NO: 12; y dicha región hipervariable CDR3_j-x difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR3-x como se muestra en la SEQ ID NO: 13; y
- 10 un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1'_j, CDR2'_j, CDR3'_j, dicha región hipervariable CDR'1_j difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR'1 como se muestra en la SEQ ID NO: 4, dicha región hipervariable CDR'2_j difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR'2 como se muestra en la SEQ ID NO: 5; y dicha región hipervariable CDR'3_j difiere por 3, preferiblemente 2, más preferiblemente 1 aminoácido(s) de la región hipervariable de CDR'3 como se muestra en la SEQ ID NO: 6; y
- 15 dicha molécula que se enlaza con IL-17 definida en b) comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1_j, CDR2_j, CDR3_j, CDR'1_j, CDR'2_j, y CDR'3_j es capaz de inhibir la actividad de IL-17 humana 1 nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20 nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula en un 50%, dicha actividad inhibitoria se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana.
- 20 La inhibición del enlazamiento de IL-17 con su receptor se puede analizar de forma conveniente en diferentes ensayos que incluyen ensayos tales como los que se describen aquí más adelante en el texto. Por el término "en la misma medida" se entiende que la referencia y las moléculas equivalentes exhiben, sobre una base estadística, una actividad inhibitoria de IL-17 esencialmente idéntica en uno de los ensayos referidos aquí (véase el Ejemplo 1). Por ejemplo, las moléculas que se enlazan con IL-17 de la invención tienen típicamente los IC₅₀ para la inhibición de la IL-17 humana en la producción de IL-6 inducida por la IL-17 humana en fibroblastos de dermis humana que están dentro de +/- x5, es decir por debajo de 10 nM, más preferiblemente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 nM de aquellos de, preferiblemente sustancialmente los mismos que, el IC₅₀ de la molécula de referencia correspondiente cuando se ensayan como se describe en el Ejemplo 1.
- 25 Alternativamente, el ensayo utilizado puede ser un ensayo de inhibición competitiva de enlazamiento de IL-17 mediante receptores de IL-17 solubles (por ejemplo los constructos R/Fc de la IL-17 humana del Ejemplo 1) y las moléculas que se enlazan con IL-17 de la invención.
- 30 Más preferiblemente, el anticuerpo de IL-17 humana comprende por lo menos
- 35 a) una cadena pesada que comprende un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a aquella mostrada en la SEQ ID NO: 8 que inicia con el aminoácido en la posición 1 y termina con el aminoácido en la posición 127 y la parte constante de una cadena pesada humana; y
- 40 b) una cadena ligera que comprende un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a aquella mostrada en SEQ ID NO: 10 que inicia con el aminoácido en la posición 1 y termina con el aminoácido en la posición 109 y la parte constante de una cadena ligera humana.
- 45 La parte constante de una cadena pesada humana puede ser del tipo γ 1, γ 2, γ 3, γ 4, μ , α 1, α 2, δ o ϵ , preferiblemente del tipo γ , más preferiblemente del tipo γ 1, mientras que la parte constante de una cadena ligera humana puede ser del tipo κ o λ (que incluye los subtipos λ 1, λ 2 y λ 3) pero es preferiblemente del tipo κ . Las secuencias de aminoácidos de todas estas partes constantes se suministran en Kabat et al. (ver más arriba).
- 50 Los conjugados de las moléculas de enlazamiento de la invención, por ejemplo conjugados de enzima o toxina o radioisótopo, también se incluyen dentro del alcance de la invención.
- 55 "Polipéptido", si no se especifica aquí de otra forma, incluye cualquier péptido o proteína que comprende los aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos, que tienen una secuencia de aminoácidos que inicia en el extremo del terminal N y termina en el extremo del terminal C. Preferiblemente el polipéptido de la presente invención es un anticuerpo monoclonal, más preferiblemente es un anticuerpo monoclonal quimérico (también llamado injertado en V) o humanizado (también llamado injertado en CDR), más preferiblemente un anticuerpo completamente humano que se puede obtener por ejemplo mediante la tecnología ilustrada en el Ejemplo 1. El anticuerpo monoclonal completamente humano o humanizado (injerado en CDR) puede o no incluir las mutaciones adicionales introducidas en las secuencias estructurales (FR) del anticuerpo aceptor.
- 60 Un derivado funcional de un polipéptido como el utilizado aquí incluye una molécula que tiene una actividad biológica cualitativa en común con un polipéptido para la presente invención, es decir que tiene la capacidad de enlazarse con la IL-17 humana. Un derivado funcional incluye fragmentos y análogos peptídicos de un polipéptido de acuerdo con la presente invención. Los fragmentos comprenden regiones dentro de la secuencia de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. El término "derivado" se utiliza para definir las
- 65

variantes de la secuencia de aminoácidos, y las modificaciones covalentes de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. Los derivados funcionales de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada, por ejemplo de la región hipervariable de la cadena ligera y pesada, tienen preferiblemente por lo menos aproximadamente 65%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 75%, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente 85%, lo más preferiblemente por lo menos aproximadamente 95, 96, 97, 98, 99% de homología total de secuencia con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada, y retiene sustancialmente la capacidad de enlazarse con la IL-17 humana o por ejemplo neutraliza la producción de IL-6 de los fibroblastos de dermis humana inducidos por IL-17.

El término "modificación covalente" incluye modificaciones de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada; o un fragmento de la misma con un agente de derivación proteínico o no proteínico orgánico, fusiones con secuencias de polipéptidos heterólogos, y modificaciones postraduccionales. Los polipéptidos modificados covalentemente, por ejemplo de una secuencia especificada, aún tienen la capacidad de enlazarse con la IL-17 humana o por ejemplo neutralizar la producción de IL-6 de los fibroblastos de dermis humana inducidos por IL-17 mediante entrecruzamiento. Tradicionalmente se introducen modificaciones covalentes al hacer reaccionar los residuos de aminoácido objetivo con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con las partes seleccionadas o los residuos terminales, o mediante mecanismos de aprovechamiento de las modificaciones postraduccionales que funcionan en las células huésped recombinantes seleccionadas. Ciertas modificaciones postraduccionales son el resultado de la acción de las células huésped recombinantes en el polipéptido expresado. Los residuos de glutamilo y asparaginilo son frecuentemente desamidados en forma postraducional hasta los residuos de glutamilo y aspartilo correspondientes. Alternativamente, estos residuos se desaminan bajo condiciones ligeramente ácidas. Otras modificaciones postraduccionales incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de los residuos serilo, tirosina o treonilo, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina, e histidina, véase por ejemplo T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79 - 86 (1983). Las modificaciones covalentes incluyen por ejemplo proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada y sus variantes de secuencia de aminoácidos, tales como inmunoadhesinas, y fusiones del terminal N con secuencias de señal heterólogas.

"Homología" con respecto a un polipéptido nativo y su derivado funcional se define aquí como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de un polipéptido nativo correspondiente, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para alcanzar el porcentaje de homología máximo, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Ni las extensiones de terminal N o del terminal C ni las inserciones se deben interpretar como reducción de la homología o de la identidad. Son bien conocidos métodos y programas de ordenador para la alineación.

"Aminoácido(s)", se refiere a todos los α -aminoácidos L que se presentan en forma natural, por ejemplo y que incluyen los aminoácidos D. Los aminoácidos se identifican ya sea por sus designaciones bien conocidas de una sola letra o de tres letras.

El término "variante de secuencia de aminoácidos" se refiere a moléculas con algunas diferencias en sus secuencias de aminoácidos cuando se compara con un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada, aún tienen la capacidad de enlazarse con la IL-17 humana o por ejemplo neutralizar la producción de IL-6 de los fibroblastos de dermis humana inducidos por IL-17. Las variantes de sustitución son aquellas que tienen por lo menos un residuo de aminoácido removido y un aminoácido diferente insertado en su lugar en la misma posición en un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. Estas sustituciones pueden ser únicas, en donde solo ha sido sustituido un aminoácido en la molécula, o pueden ser múltiples, en donde se han sustituido dos o más aminoácidos en la misma molécula. Las variantes de inserción son aquellas con uno o más aminoácidos insertados en forma inmediatamente adyacente a un aminoácido en una posición particular en un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. Inmediatamente adyacente a un aminoácido significa conectado ya sea al grupo funcional α -carboxi o α -amino del aminoácido. Las variantes de supresión son aquellas con uno o más aminoácidos removidos en un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. Ordinariamente, las variantes de supresión tendrán de uno o dos aminoácidos suprimidos en una región particular de la molécula.

Una molécula que se enlaza con IL-17 de la invención puede ser producida mediante técnicas de ADN recombinante. En vista de esto, se pueden construir una o más moléculas de ADN que codifican las moléculas de enlazamiento, colocadas bajo secuencias de control apropiadas y transferidas a un organismo huésped adecuado para expresión.

En una forma muy general, se divulgan por lo tanto

(i) moléculas de ADN que codifican una molécula que se enlaza con IL-17 de una sola cadena de la invención, una molécula que se enlaza con IL-17 que comprende una cadena ligera y una pesada como se define aquí, o fragmentos de una molécula que se enlaza con IL-17 de la invención; y

5 (ii) el uso de las moléculas de ADN de la invención para la producción de una molécula que se enlaza con IL-17 de la invención mediante medios recombinantes.

Por lo tanto, la invención proporciona un constructo de ADN que codifica un anticuerpo que se enlaza con IL-17 como se describió anteriormente.

10 Adicionalmente, la invención proporcionamos un constructo de ADN que comprende una molécula de ADN que es sustancialmente homóloga a la SEQ ID NO: 7 o a la SEQ ID NO: 9.

El estado presente del arte es tal que alguien capacitado en el arte es capaz de sintetizar las moléculas de ADN de la invención con la información suministrada aquí, es decir las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables y las secuencias de ADN que las codifican. Un método para construir un gen de dominio variable se describe por ejemplo en el documento EPA 239 400 y se puede resumir brevemente como sigue: se clona un gen que codifica un dominio variable de un MAb de cualquier especificidad. Se determinan los segmentos de ADN que codifican la estructura y las regiones hipervariables y se remueven los segmentos de ADN que codifican las regiones hipervariables de tal manera que se fusionen los segmentos de ADN que codifican las regiones estructurales junto con los sitios de restricción adecuados en las uniones. Los sitios de restricción se pueden generar en las posiciones apropiadas mediante mutagénesis de la molécula de ADN mediante procedimientos estándar. Se preparan los casetes de CDR sintéticos bicatenarios mediante síntesis de ADN de acuerdo con las secuencias que codifican la SEQ ID NO: 1 (CDR1), SEQ ID NO: 2 (CDR2), SEQ ID NO: 3 (CDR3), SEQ ID NO: 4 (CDR1'), SEQ ID NO: 5 (CDR2'), SEQ ID NO: 6 (CDR6'), SEQ ID NO: 11 (CDR1-x), SEQ ID NO: 12 (CDR2-x), SEQ ID NO: 13 (CDR3-x).
 15
 20
 25 Estos casetes se proporcionan con extremos adhesivos de manera que se pueden ligar en las uniones de la estructura.

Adicionalmente, no es necesario tener acceso al ARNm de una línea de células que producen hibridomas con el fin de obtener un constructo de ADN que codifica para las moléculas que se enlazan con IL-17 de la invención. De este modo, la solicitud PCT WO 90/07861 proporciona instrucciones completas para la producción de un anticuerpo mediante técnicas de ADN recombinante suministrando únicamente información escrita como la secuencia de nucleótidos del gen. El método comprende la síntesis de una cantidad de oligonucleótidos, su amplificación mediante el método de PCR, y su empalme para producir la secuencia de ADN deseada.

30 Los vectores de expresión que comprenden un promotor adecuado o genes que codifican partes constantes de cadena ligera y pesada se encuentran públicamente disponibles. Por lo tanto, una vez que se prepara una molécula de ADN de la invención, esta se puede transferir de manera conveniente a un vector de expresión apropiado. Las moléculas de ADN que codifican los anticuerpos de cadena sencilla también se pueden preparar mediante métodos estándar, por ejemplo, como se describe en el documento WO 88/1649.

40 En analogía con el caso para los equivalentes de CDR, el término "equivalentes directos de ADN_H de los mismos" se entiende que significa un primer constructo de ADN que codifica una cadena pesada o fragmento de la misma de una molécula que se enlaza con IL-17 y comprende:

45 a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende alternativamente la estructura y las regiones hipervariables, estando dichas regiones hipervariables en la secuencia CDR1_j, CDR2_j y CDR3_j, dicha CDR1_j es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR1 como se muestra en la SEQ ID NO: 1, dicha CDR2_j es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR2 como se muestra en la SEQ ID NO: 2, y CDR3_j es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR3 como se muestra en la SEQ ID NO: 3; esta primera parte empieza con un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable y termina con un codón que codifica el último aminoácido del dominio variable; y

50 b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena pesada o fragmento de la misma que inicia con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena pesada y finaliza con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento de la misma, seguido por un codón de detención; y

55 c) dicho constructo de ADN que codifica para un polipéptido que es capaz, ya sea solo o en combinación con otro polipéptido, de inhibir la actividad de la IL-7 humana 1 nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20 nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula en un 50%, dicha actividad inhibidora se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana.

60 De forma similar, el término "equivalentes directos de ADN_{H-x} de los mismos" se entiende que significa un primer constructo alternativo de ADN que codifica una cadena pesada o fragmento de la misma de una molécula que se enlaza con IL-17 y comprende:

65

- 5 a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende alternativamente las regiones hipervariables y de estructura, estando dichas regiones hipervariables en la secuencia CDR1_{j-x}, CDR2_{j-x} y CDR3_{j-x}, dicha CDR1_{j-x} es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR1 como se muestra en la SEQ ID NO: 11, dicha CDR2_{j-x} es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR2 como se muestra en la SEQ ID NO: 12, y CDR3_{j-x} es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR3 como se muestra en la SEQ ID NO: 13; esta primera parte empieza en un codón que codifica al primer aminoácido del dominio variable y termina con un codón que codifica al último aminoácido del dominio variable; y
- 10 b) una segunda parte que codifica una parte constante de la cadena pesada o fragmento de la misma que inicia con un codón que codifica al primer aminoácido de la parte constante de la cadena pesada y finaliza con un codón que codifica al último aminoácido de la parte constante o fragmento de la misma, seguido por un codón de detención; y
- 15 c) dicho constructo de ADN que codifica para un polipéptido que es capaz ya sea solo o en combinación con otro polipéptido de inhibir la actividad de la IL-7 humana 1 nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20 nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula en un 50%, dicha actividad de inhibición se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana.

- 20 Preferiblemente, estos constructos de ADN codifican un dominio variable que comprende alternativamente las regiones hipervariable y de estructura, estando dichas regiones hipervariables en la secuencia CDR1, CDR2 y CDR3, teniendo dicha CDR1 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, teniendo dicha CDR2 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y teniendo dicha CDR3 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. Más preferiblemente, estos constructos de ADN codifican un dominio variable que comprende alternativamente las regiones hipervariable y de estructura, estando dichas regiones hipervariables en la secuencia CDR1-x, CDR2-x y CDR3-x, teniendo dicha CDR1-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, teniendo dicha CDR2-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, y teniendo dicha CDR3-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13. Más preferiblemente, esta primera parte codifica un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 8 que
- 25 inicia con el aminoácido en la posición 1 y termina con el aminoácido en la posición 127. Más preferiblemente la primera parte tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 7 partiendo con el nucleótido en la posición 1 y finalizando con el nucleótido en la posición 381. También preferiblemente, la segunda parte codifica la parte constante de una cadena pesada humana, más preferiblemente la parte constante de la cadena γ 1 humana. Esta segunda parte puede ser un fragmento de ADN de origen genómico (que comprende intrones) o un fragmento de ADNc (sin intrones).
- 30
- 35

De forma similar, el término "equivalentes directos de ADN_L de los mismos" significa que representa un segundo constructo de ADN que codifica una cadena ligera o fragmento de la misma de una molécula que se enlaza con IL-17 y comprende:

40

- a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende alternativamente las regiones hipervariables y de estructura; siendo dichas regiones hipervariables CDR3_{j'} y opcionalmente CDR1_{j'} y CDR2_{j'}, dicha CDR1_{j'} es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR1' como se muestra en la SEQ ID NO: 4, dicha CDR2_{j'} es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR2' como se muestra en la SEQ ID NO: 5, y dicha CDR3_{j'} es por lo menos 50% homóloga, preferiblemente por lo menos 60, 70, 80, 85, o 90% homóloga, más preferiblemente por lo menos 95% homóloga a la región hipervariable CDR3' como se muestra en la SEQ ID NO: 6; esta primera parte empieza en un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable y termina con un codón que codifica el último aminoácido del dominio variable; y
- 45
- 50 b) una segunda parte que codifica una parte constante de la cadena ligera o fragmento de la misma que inicia con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de la cadena ligera y termina con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento de la misma seguido por un codón de detención; y
- 55 c) dicho constructo de ADN que codifica para un polipéptido que es capaz ya sea solo o en combinación con otro polipéptido de inhibir la actividad de la IL-7 humana 1 nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20 nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula en un 50%, dicha actividad inhibitoria se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana.

- 60 Preferiblemente, este segundo constructo de ADN codifica un dominio variable que comprende alternativamente las regiones hipervariables y de estructura, estando dichas regiones hipervariables en la secuencia CDR1', CDR2' y CDR3', teniendo dicha CDR1' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, teniendo dicha CDR2' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y teniendo dicha CDR3' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6. Más preferiblemente, esta primera parte del segundo constructo de ADN codifica un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 10 que inicia con el aminoácido en la posición 1 y termina con el aminoácido en la posición 109. Más
- 65

preferiblemente, la primera parte tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 9 partiendo con el nucleótido en la posición 1 y finalizando con el nucleótido en la posición 327. También preferiblemente, la segunda parte codifica la parte constante de una cadena ligera humana, más preferiblemente la parte constante de la κ humana.

5 Preferiblemente, se utilizarán juntos el primero y el segundo constructo de ADN, pero también se pueden utilizar por separado.

10 Se divulgan moléculas que se enlazan con IL-17 en las que uno o más de los residuos de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, CDR1-x, CDR2-x, CDR3-x, CDR1', CDR2' o CDR3' o las estructuras, típicamente se cambian solo unos pocos (por ejemplo 1-4); por ejemplo mediante mutación por ejemplo mutagénesis dirigida al sitio de las secuencias de ADN correspondientes. En particular la invención incluye las moléculas que se enlazan con IL-17 en las que uno o más residuos de CDR1' o CDR2' han sido cambiados a partir de los residuos mostrados en la SEQ ID NO: 4 (para CDR1') y SEQ ID NO: 5 (para CDR2').

15 En el primero y el segundo constructos de ADN, se pueden separar la primera y segunda partes mediante un intrón, y, se puede ubicar de forma conveniente un reforzador en el intrón entre la primera y segunda partes. La presencia de tal reforzador que se transcribe pero no se traduce, puede ayudar a una transcripción eficiente. En realizaciones particulares, el primero y el segundo constructos de ADN comprenden al reforzador de un gen de cadena pesada convenientemente de origen humano.

20 Cada uno de los constructos de ADN se ponen bajo el control de secuencias de control adecuadas, en particular bajo el control de un promotor adecuado. Se puede utilizar cualquier clase de promotor, siempre y cuando se adapte al organismo huésped en el que se transferirán los constructos de ADN para expresión.

25 El anticuerpo deseado se puede producir en un cultivo celular o en un animal transgénico. Se puede obtener un animal transgénico adecuado de acuerdo con métodos estándar que incluyen microinyección en óvulos del primero y segundo constructos de ADN colocados bajo secuencias de control adecuadas que transfieren los óvulos así preparados en las hembras seudopreñadas apropiadas y seleccionar un descendiente que expresa el anticuerpo deseado.

30 Cuando se producen cadenas de anticuerpo en un cultivo celular, se pueden insertar primero los constructos de ADN ya sea en un único vector de expresión o en dos vectores de expresión separados pero compatibles, siendo el último posiblemente el preferido.

35 Por lo tanto, la invención también proporciona un vector de expresión capaz de replicar en una línea celular procarionta o eucarionta que comprende por lo menos uno de los constructos de ADN descritos anteriormente.

40 Cada vector de expresión que contiene un constructo de ADN es luego transferido a un organismo huésped adecuado. Cuando los constructos de ADN se insertan de forma separada en dos vectores de expresión, se pueden transferir de forma separada, es decir un tipo de vector por célula, o se transfieren en forma conjunta, siendo esto último lo preferido. Un organismo huésped adecuado puede ser una bacteria, una levadura o una línea celular de mamífero, siendo esto último lo preferido. Más preferiblemente, la línea celular de mamífero es de origen linfocítico, por ejemplo un mieloma, hibridoma o una célula B inmortalizada normal, que no expresa de manera conveniente ninguna cadena pesada o ligera de anticuerpo endógeno.

45 Para la expresión en células de mamífero se prefiere que la secuencia que codifica la molécula que se enlaza con IL-17 se integre en el ADN de la célula huésped dentro de una posición que permite o favorece un alto nivel de expresión de la molécula que se enlaza con IL-17. Las células en las que la secuencia que codifica la molécula que se enlaza con IL-17 se integran en tales posiciones favorables se pueden identificar y seleccionar con base en los niveles de la molécula que se enlaza con IL-17 que ellos expresan. Se puede utilizar cualquier marcador seleccionable adecuado para la preparación de las células huésped que contienen la secuencia que codifica la molécula que se enlaza con IL-17; por ejemplo, se puede utilizar un sistema gen dhfr / metotrexato o un sistema de selección equivalente. Los sistemas alternativos para la expresión de las moléculas que se enlazan con IL-17 de la invención incluyen sistemas de amplificación/selección basados en GS, tales como aquellos descritos en los documentos EP 0256055 B, EP 0323997 B y la solicitud de patente europea No. 89303964.4.

50 En un aspecto adicional de la invención se proporciona un proceso para el producto de una molécula que se enlaza con IL-17 que comprende (i) cultivar un organismo que se transforma con un vector de expresión como se definió anteriormente y (ii) recuperar la molécula que se enlaza con IL-17 del cultivo.

55 Para los propósitos de la presente descripción un anticuerpo es "capaz de inhibir el enlazamiento de IL-17 como AIN457" si el anticuerpo es capaz de inhibir el enlazamiento de IL-17 a su receptor sustancialmente en la misma medida que el anticuerpo AIN457, en donde "en la misma medida" tiene el significado como se definió anteriormente.

65

El anticuerpo AIN457 tiene afinidad de enlazamiento por IL-17 que es mayor que las afinidades previamente reportadas para los anticuerpos anti-IL-17, en particular con cualquier de los anticuerpos anti IL-17 humanos. Por lo tanto, AIN457 tiene una constante de equilibrio de disociación K_D para el enlazamiento con IL-17 de aproximadamente $0,188 \pm 0,036$ nM (determinado por BIAcore, por ejemplo como se muestra en el Ejemplo 2). Esta alta afinidad de enlazamiento hace que el anticuerpo AIN457 sea particularmente adecuado para aplicaciones terapéuticas.

En la presente descripción la frase "enfermedad mediada por IL-17" abarca todas las enfermedades y afecciones médicas en las que el IL-17 cumple una función, ya sea directa o indirectamente, en la enfermedad o condición médica, que incluye la causalidad, desarrollo, progreso, persistencia o patología de la enfermedad o condición.

En la presente descripción los términos "tratamiento" o "tratar" se refieren tanto a tratamiento profiláctico como preventivo así como también tratamiento curativo o que modifica la enfermedad, incluyendo el tratamiento del paciente en riesgo de contraer la enfermedad o que se sospecha de haber contraído la enfermedad así como pacientes que están enfermos o que se han diagnosticados por sufrir de una enfermedad o condición médica, e incluye supresión de la recaída clínica.

Las moléculas que se enlazan con IL-17 como se definió anteriormente tienen especificidad de enlazamiento por la IL-17 humana, en particular anticuerpos que son capaces de inhibir el enlazamiento de IL-17 con su receptor; y anticuerpos con IL-17 que son capaces de inhibir la actividad de la IL-7 humana 1 nM (= 30 ng/ml) en una concentración de 50 nM, preferiblemente 20 nM, más preferiblemente 10 nM, más preferiblemente 5 nM de dicha molécula en un 50%, dicha actividad de inhibición se mide en la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana, se denominan aquí como los Anticuerpos de la invención.

Preferiblemente los Anticuerpos de la invención son anticuerpos humanos, más preferiblemente el anticuerpo AIN457 o los equivalentes directos de los mismos.

Los Anticuerpos de la invención bloquean los efectos de IL-17 sobre sus células objetivo y por lo tanto son indicados para uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por IL-17. Estas y otras actividades farmacológicas de los Anticuerpos de la invención se pueden demostrar en métodos de prueba estándar por ejemplo como se describe a continuación:

Neutralization of IL-17 dependent production of interleukin-6 by primary human fibroblasts: La producción de IL-6 en fibroblastos primarios humanos (dérmicos) es dependiente de IL-17 (Hwang SY et al., (2004) Arthritis Res Ther; 6:R120-128.

En resumen, se estimulan fibroblastos de dermis humana con IL-17 recombinante en presencia de diferentes concentraciones del Anticuerpo de la invención o el receptor de la IL-17 humana con la parte Fc. Se usa el anticuerpo anti-CD25 quimérico Simulect® (basiliximab) como control negativo. Se recoge el sobrenadante después de 16 h de estimulación y se evalúa para IL-6 mediante ELISA. Los anticuerpos de la invención tienen típicamente los IC_{50} para la inhibición de la producción de IL-6 (en la presencia de la IL-17 humana 1 nM) de aproximadamente 50 nM o menos (por ejemplo de aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 50 nM) cuando se prueba como se hizo anteriormente, es decir dicha actividad inhibitoria se mide sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos de dermis humana. Preferiblemente, los Anticuerpos de la invención tienen un IC_{50} para la inhibición de la producción de IL-6 como se definió anteriormente de aproximadamente 20 nM o menos, más preferiblemente de aproximadamente 10 nM o menos, más preferiblemente de aproximadamente 5 nM o menos, más preferiblemente de aproximadamente 2 nM o menos, más preferiblemente de aproximadamente 1 nM o menos.

Como se indicó en el ensayo anterior los Anticuerpos de la invención bloquean potencialmente los efectos de IL-17. De acuerdo con lo anterior, los Anticuerpos de la invención tienen utilidad farmacéutica de la siguiente manera:

Los anticuerpos de la invención son útiles para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades mediadas por IL-17 o condiciones médicas, por ejemplo condiciones inflamatorias, alergias y condiciones alérgicas, reacciones de hipersensibilidad, enfermedades autoinmunes, infecciones severas, y rechazo de trasplantes de tejidos u órganos.

Por ejemplo, los Anticuerpos de la invención se pueden utilizar para el tratamiento de receptores de trasplantes de corazón, pulmón, trasplantes combinados de corazón-pulmón, hígado, riñón, trasplantes pancreáticos, trasplantes de piel o de córnea, que incluyen rechazo del aloinjerto o rechazo del xenoinjerto, y para la prevención de enfermedades de injerto versus huésped, tal como luego de trasplante de médula ósea, y arteriosclerosis asociada con trasplante de órganos.

Los anticuerpos de la invención son particularmente útiles para el tratamiento, prevención, o mejoría de enfermedades autoinmunes y de condiciones inflamatorias, en particular soriasis.

Para estas indicaciones, la dosificación apropiada, por supuesto, variará dependiendo, por ejemplo, del Anticuerpo particular de la invención que se va a emplear, el huésped, el modo de administración y la naturaleza y severidad de la condición que se va a tratar. Sin embargo, en el uso profiláctico, se indica que se obtienen resultados satisfactorios en general con dosis de aproximadamente 0,05 mg hasta aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal, más usualmente aproximadamente desde 0,1 mg hasta aproximadamente 5 mg por kilogramo de peso corporal. La frecuencia de dosificación para usos profilácticos estará normalmente en el rango de aproximadamente una vez por semana hasta aproximadamente una vez cada 3 meses, más usualmente en el rango de aproximadamente una vez cada 2 semanas hasta aproximadamente una vez cada 10 semanas, por ejemplo una vez cada 4 a 8 semanas. El anticuerpo de la invención se administra de forma conveniente en forma parenteral, intravenosa, por ejemplo en la vena antecubital u otra vena periférica, en forma intramuscular, o subcutánea. Un tratamiento profiláctico comprende típicamente administrar el Anticuerpo de la invención una vez por mes hasta una vez cada 2 a 3 meses, o menos frecuentemente.

Los Anticuerpos de la invención se pueden administrar como un único ingrediente activo o en conjunto con, por ejemplo, como un adyuvante para o en combinación con, otros fármacos por ejemplo agentes inmunosupresores o agentes inmunomoduladores u otros agentes antiinflamatorios, por ejemplo para el tratamiento o prevención de las enfermedades mencionadas anteriormente. Por ejemplo, los Anticuerpos de la invención se pueden utilizar en combinación con DMARD, por ejemplo sales de oro, sulfasalazina, agentes contra la malaria, metotrexato, D-penicilamina, azatioprina, ácido micofenólico, ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus, minociclina, leflunomida, glucocorticoides; un inhibidor de calcineurina; un modulador de recirculación de linfocitos, por ejemplo FTY720 y análogos de FTY720; un inhibidor de mTOR, por ejemplo rapamicina, 40-O-(2-hidroxiethyl)-rapamicina, CCI779, ABT578, AP23573 o Tafa-93; una ascomicina que tiene propiedades inmunosupresoras, por ejemplo ABT-281, ASM981, etc.; corticosteroides; ciclofosfamida; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico; mofetil micofenolato; 15-desoxiespergualina o un homólogo inmunosupresor, análogo o derivado del mismo; anticuerpos monoclonales inmunosupresores, por ejemplo, anticuerpos monoclonales para los receptores de leucocitos, por ejemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD40, CD45, CD58, CD80, CD86 o sus ligandos; otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo una molécula de enlazamiento recombinante que tiene por lo menos una porción del dominio extracelular de CTLA4 o un mutante de la misma, por ejemplo por lo menos una porción extracelular de CTLA4 o un mutante de la misma unida a una secuencia de proteína diferente de CTLA4, por ejemplo CTLA4lg (por ejemplo la designada como ATCC 68629) o un mutante de la misma, por ejemplo LEA29Y; inhibidores de molécula de adhesión, por ejemplo antagonistas de LFA-1, antagonistas de ICAM-1 o ICAM-3, antagonistas de VCAM-4 o antagonistas de VLA-4; o un agente quimioterapéutico, por ejemplo paclitaxel, gemcitabina, cisplatino, doxorubicina o 5-fluorouracilo; agentes anti TNF, por ejemplo anticuerpos monoclonales para TNF, por ejemplo infliximab, adalimumab, CDP870, o constructos del receptor para TNF-RI o TNF-RII, por ejemplo Etanercept, PEG-TNF-RI; bloqueadores de las citoquinas proinflamatorias, bloqueadores de IL-1, por ejemplo Anakinra o trampa de IL-1, AAL160, ACZ 885, bloqueadores de IL-6; bloqueadores de quimoquinas, por ejemplo inhibidores o activadores de proteasas, por ejemplo metaloproteasas, anticuerpos anti-IL-15, anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos anti-CD20, los NSAID, tales como aspirina o un agente antiinfeccioso (la lista no se limita a los agentes mencionados).

De acuerdo con lo anterior la presente invención proporciona en un aspecto aún adicional:

Una combinación terapéutica, por ejemplo un kit, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de a) una molécula que se enlaza con IL-17, por ejemplo un Anticuerpo de la invención, y b) por lo menos una segunda sustancia seleccionada de un inmunosupresor / inmunomodulador, un quimioterapéutico antiinflamatorio o un fármaco antiinfeccioso, por ejemplo como se indicó anteriormente. El kit puede comprender instrucciones para su administración.

Cuando los Anticuerpos de la invención se administran junto con otros inmunosupresores / inmunomoduladores, quimioterapéuticos antiinflamatorios o una terapia antiinfecciosa, las dosis del compuesto de combinación administrado en forma conjunta variarán por supuesto dependiendo del tipo de cofármaco empleado, por ejemplo si se trata de un DMARD, anti-TNP, bloqueador de IL-1 u otros, del fármaco específico empleado, de la condición que está siendo tratada, etc.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden fabricar de manera convencional. Una composición de acuerdo con la invención se proporciona preferiblemente en forma liofilizada. Para administración inmediata esta se disuelve en un portador acuoso adecuado, por ejemplo agua estéril para inyección o solución salina fisiológica amortiguada estéril. Si se considera deseable elaborar una solución de mayor volumen para administración mediante infusión como una inyección de bolo, es conveniente incorporar albúmina de suero humano o la propia sangre heparinizada del paciente en la solución salina al momento de la formulación. Alternativamente, la formulación se suministra en forma subcutánea. La presencia de un exceso de tal proteína fisiológicamente inerte evita la pérdida de anticuerpo por adsorción en las paredes del contenedor y de la tubería utilizada con la solución de infusión. Si se utiliza albúmina, una concentración adecuada es de 0,5 a 4,5% en peso de la solución salina. Otras formulaciones comprenden una formulación líquida o liofilizada.

La invención se describe adicionalmente a manera de ilustración en los siguientes Ejemplos.

Ejemplos

5 Se utilizan ratones transgénicos modificados mediante ingeniería genética para expresar el repertorio IgG/k humana en lugar del repertorio de inmunoglobulina de murino (Fishwild et al., 1996, Nat Biotechnol., 14, 845 - 851) para generar los anticuerpos para la IL-17 humana. Las células B de estos ratones se immortalizan mediante tecnología de hibridoma estándar y se obtienen células de hibridoma de murino que secretan el anticuerpo AIN457 de IgG1/k humano.

10 **Ejemplo 1:** Generación del hibridoma, purificación de los anticuerpos, selección del anticuerpo AIN457

15 *Producción de la IL-17 humana recombinante (hull-17):* La hull-17 recombinante se produce ya sea en *E. coli* en cuerpos de inclusión y se repliega mediante técnicas convencionales (producción propia libre de portador (*E. coli*; Novartis Pharma, lote BME3141/ 98) o adquirida (libre de portador, *E. coli*; R&D Systems #317-IL/CF)) o como una proteína secretada y parcialmente glicosilada en HEK.EBNA (hull-17 recombinante, libre de portador (IL-17 APP-C6 a partir de células HEK/EBNA transfectadas; Novartis Pharma, lote En.E-3382/82; 0,28 mg/ml; hull-17 recombinante, libre de portador (IL-17 APP-C4 a partir de células HEK/EBNA transfectadas; Novartis Pharma, lote En.E-3382/83; 0,29 mg/ml)). Esta última forma tiene una extensión de 4 aminoácidos en el terminal C para la purificación rápida a partir de los sobrenadantes del cultivo mediante cromatografía de inmunoafinidad. En este caso, se cargan sobrenadantes de cultivo en una columna de tamaño apropiado de un anticuerpo anti-etiqueta inmovilizado específico acoplado a Sefarosa 4B activada con CNBr con una densidad de 10 mg/ml de resina siguiendo las instrucciones del fabricante (Pharmacia). Después del lavado inicial con PBS, se eluye la hull-17 enlazada con glicina a 100 mM, pH 2,7 y se neutraliza inmediatamente con NaOH diluido.

25 *Acoplamiento de hull-17 con Hemocianina de Lapa Ojo de Cerradura (KLH):* la hull-17 producida ya sea en *E. coli* o HEK.EBNA se acopla a la KLH preactivada con un exceso del entrecruzador homobifuncional de suberato de disuccinimidilo (DSS). En resumen, se reconstituyen 20 mg de KLH Imject® Mariculture liofilizado (Pierce # 77600) con 2 ml de H₂O para producir una solución de 10 mg/ml que contiene solución salina amortiguada con fosfato (PBS), pH 7,2. A esta solución se le agregan 400 µl 250 mM de DSS en sulfóxido de dimetilo (DMSO) y se agita la mezcla durante aproximadamente 1 h a temperatura ambiente (no todo el reactivo se disuelve y se forma algún precipitado). Después de una breve centrifugación y filtración (0,45 µm) se desaliniza luego la solución en Sefadex G25 fino (Pharmacia) en PBS (velocidad de flujo 2 ml/min) produciendo aproximadamente 11 mg de KLH activada a razón de 1,5 mg/ml (Bradford). Se mezcla 1 ml del KLH activada (1,5 mg) con 1 ml de una solución de 9 mg/ml en agua de hull-17 derivada de *E. coli* liofilizada (lote BM-E3141/98). La solución permanece clara y se incuba durante 35 2 h a temperatura ambiente. La concentración del complejo resultante es de 1,4 mg/ml (medida por Bradford). Se mezcla 1 ml de KLH activada (1,5 mg) con 1 ml de hull-17 HEK.EBNA (aproximadamente 3 mg en agua; lote En.E-3382/83). La solución permanece clara y se incuba durante 2 h a temperatura ambiente. La concentración (Bradford) es de 2,9 mg/ml.

40 *Inmunización:* Los ratones modificados mediante ingeniería genética 27340 (hembra; MEDAREX Inc, Annandale, NJ) en los que los genes de la parte variable y la parte constante de la inmunoglobulina de murino se reemplazan funcionalmente por sus contrapartes humanas (código Genotype Tg 221100-TgH (CMD)++;TgN(Hco7)11952+; TgH(JKD)++; TgN(KCO5)9272+ (véase también Sherie L. Morrison, 1994, Nature, Vol. 368, p. 812 - 813; Nils Lonberg et al., 1994, Nature, Vol. 368, p. 856 - 859) se inmunizan siguiendo el esquema reportado en la tabla 1.

45

Tabla 1. Programa de inmunización

Día	Fecha	Inmunógeno	Dosis y ruta de inmunización
0	07.06.01	HuL-17 (BM-E3141/98) acoplada con KLH mezclada 1:1 con hull-17 (BM-E3141/98) en adyuvante de Gerbu	25 mg de cada una en forma subcutánea en dos lugares; volumen total/ratón con 100 µl de adyuvante
14	21.06.01 (1er refuerzo)	HuL-17 (BM-E3141/98) acoplada con KLH mezclada 1:1 con hull-17 (En.E-3382/83) acoplada con KLH en adyuvante de Gerbu	25 mg de cada una en forma subcutánea en dos lugares; volumen total/ratón con 100 µl de adyuvante
(continuación)			
Día	Fecha	Inmunógeno	Dosis y ruta de inmunización
28	05.07.01 (2do refuerzo)	HuL-17 (BM-E3141/98) mezclada 1:1 con hull-17 (En.E-3382/83) en adyuvante de Gerbu	10 mg de cada una en forma subcutánea en dos lugares; volumen total/ratón con 100 µl de adyuvante
35	12.07.01		Sueros recolectados por ELISA
42	19.07.01 (3er refuerzo)	HuL-17 (BM-E3141/98) mezclada 1:1 con hull-17	25 mg de cada una en forma

	refuerzo)	(En.E-3382/83) acoplada con KLH en adyuvante de Gerbu	subcutánea en dos lugares; volumen total/ratón con 100 µl de adyuvante
63	09.08.01 (4to refuerzo)	HuL-17 (BM-E3141/98) acoplada con KLH mezclada 1:1 con huL-17 (En.E-3382/83) acoplada con KLH en adyuvante de Gerbu	20 mg de cada una en forma subcutánea en dos lugares; volumen total/ratón con 100 µl de adyuvante
91	06.09.01 (5to refuerzo)	HuL-17 (BM-E3141/98) mezclada 1:1 con huL-17 (En.E-3382/83) en adyuvante de Gerbu	20 mg de cada una en forma subcutánea en dos lugares; volumen total/ratón con 100 µl de adyuvante
99	14.09.01		Sueros recolectados por ELISA
117	02.10.01	HuL-17 (En.E-3382/83) HuL-17 (En.E-3382/83) acoplada con KLH	10 µg/ratón en forma intravenosa 10 µg/ratón en forma intraperitoneal
118	03.10.01	HuL-17 (En.E-3382/83) acoplada con KLH	10 µg/ratón en forma intraperitoneal
119	04.10.01	HuL-17 (En.E-3382/83) acoplada con KLH	10 µg/ratón en forma intraperitoneal
120	05.10.01	fusión	

Se obtienen muestras de suero 35 y 99 días después del inicio del protocolo de inmunización, para medir niveles de anticuerpo anti-huL17 mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

- 5 *Generación de hibridomas:* En el día 120, se sacrifica un ratón 27340 mediante inhalación de CO₂. Se fusionan todas las células de bazo (1×10^8) con células PAI-0 (5×10^7 células) utilizando PEG 4000. Las células fusionadas se colocan en 720 pozos (1 ml/pozo), que contienen una capa alimentadora de células peritoneales de ratón (ratones Balb/c), en medio HAT (RPMI 1640 que contiene 2 g/l de bicarbonato de sodio, 5×10^{-5} M de β -mercaptoetanol, 10^{-4} M de Hipoxantina, $1,6 \times 10^{-5}$ M de timidina, 4×10^{-7} M de aminopterina, 10% de FCS inactivado por calor y 50 µg/ml de gentamicina). En el día 14, se cambia el medio HAT por medio HT, es decir medio HAT sin aminopterina. La selección inicia en el día 10, y dura dos semanas. De los 720 pozos iniciales de la placa, 684 pozos (95%) son positivos para el crecimiento de hibridoma. Se recolectan los sobrenadantes y se seleccionan los MAb reactivos a huL-17 en ELISA utilizando tanto las huL-17 derivadas de *E. coli* como las derivadas de HEK/EBNA. Cincuenta y dos pozos principales dieron resultados positivos para la presencia de anticuerpos anti-huL-17. Se clonan veintiocho hibridomas y se congelan los restantes. Se hace la clonación, en 4 placas de microtitulación de 96 pozos, en medio HT y una capa alimentadora de células peritoneales de ratón. Se siembran en placa los hibridomas a razón de 0,5 células/100 µl por pozo. Los pozos se seleccionan microscópicamente para detectar crecimiento, y los positivos se cargan en 100 µl de medio HT. Al siguiente día, se analizan los sobrenadantes para detectar la producción de anticuerpo en un ELISA específico para huL-17. Luego de la clonación, la mayor parte de los hibridomas clonados retienen la capacidad de secretar el Anticuerpo monoclonal específico anti-huL-17 (MAb).

- 25 *Producción y purificación del anticuerpo:* Se transfieren los clones seleccionados en medio libre de suero (5 ml) en matraces de TC de 25 cm² (TC: cultivo de tejido). Los hibridomas se expanden progresivamente en medio libre de suero en matraces de TC de 75 cm² y matraces de rodillo. Todos los MAb anti-hu-IL-17 diferentes incluyendo NVP-AIN457-NX (340-110-28 es decir número de ratón - número de hibridoma - número de clon) se purifican mediante cromatografía de afinidad de Proteína A. Los sobrenadantes de cultivo se ajustan a pH 7,3 y se cargan en una columna de tamaño apropiado de Sefarosa 4 de Proteína A de flujo rápido (Pharmacia). Después de lavado inicial con amortiguador de fosfato 100 mM, pH 7,3, los anticuerpos enlazados se eluyen con citrato 50 mM, pH 2,7, NaCl 140 mM. La fracción eluida se neutraliza inmediatamente (pH 7,0) y se filtra en forma estéril. La concentración de proteína se determina mediante absorción a 280 nm utilizando un factor de 1,35 Unidades de Absorción (AU)/mg.

- 35 *Actividad inhibitoria de MAb anti-huL-17 sobre la producción de IL-6 inducida por huL-17 en fibroblastos de dermis humana:* Se cultivan fibroblastos de dermis humana en FBM complementado con 2% de FCS, insulina (5 µg/ml) huFGF-básico (0,1 µg/ml) y Gentamicina (50 µg/ml). Los fibroblastos se separan del plástico utilizando una solución de Tripsina/EDTA. Los fibroblastos se distribuyen en placas de microtitulación de 96 pozos con una densidad de 1×10^4 células/pozo en FBM complementado con 1% de FCS. Se dejan adherir los fibroblastos a las placas durante la noche. A la mañana siguiente se remueve el medio y se añaden FBM fresco complementado con 1% de FCS, huL-17 (diferentes concentraciones que varían de 30 a 500 ng/ml) y sobrenadantes de hibridoma (dilución final 1/5) o los anticuerpos purificados hasta un volumen final de 200 µl. Se recolectan los sobrenadantes del cultivo después de una incubación durante 24 h y se mide la producción de huL-6 mediante ELISA.

- 45 *ELISA para la detección de anticuerpos anti-huL-17:* Se recubren placas de microtitulación de ELISA con huL-17 recombinante (100 µl/pozo a razón de 3 µg/ml; lote BM-E3141/98 o En.E-3382/82) en PBS / 0,02% de NaN₃ y se incuba durante la noche a temperatura ambiente. Al siguiente día, se bloquean las placas de microtitulación con 300 µl de PBS / 2% de BSA / 0,02% de NaN₃ durante 2 h a 37°C. Se lavan luego las placas 4 veces con PBS / 0,05% de Tween 20 / 0,02% de NaN₃. Se agregan las diluciones de suero de ratón 27340 (rango final de dilución en el día 35: 1/100 a 1/3200; rango final de dilución en el día 99: 1/200 a 1/12800; 100 µl/pozo) o los sobrenadantes de cultivo de

hibridomas (dilución final 1:3; 100 µl/pozo). Después de incubación durante la noche a temperatura ambiente, se lavan las placas 4 veces con PBS / 0,05% de Tween 20 / 0,02% de NaN₃. Se agrega un anticuerpo específico del fragmento Fc, anti-hu-IgG de ratón conjugado con biotina, hasta una dilución final de 1/20000 (100 µl/pozo). Se dejan reaccionar las muestras durante 4 h a temperatura ambiente. Después de lavar (4 veces), se agrega estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina hasta una dilución final de 1/8000 (100 µl/pozo). Después de 40 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavan de nuevo 4 veces y se agrega el sustrato (p-nitrofenilfosfato en amortiguador de dietilamino pH 9,8; 150 µl/pozo). Se leen las placas después de 30 o 45 min dependiendo del desarrollo de la reacción en un lector de microtitulación (Bio-Rad) utilizando filtros de 405 y 490 nm.

5
10 *ELISA para detección del isotipo del anticuerpo:* Para revelar el isotipo del MAb, se agregan los sobrenadantes del cultivo (100 µl; dilución final 1/5) a los pozos de las placas de microtitulación recubiertas con hUL-17 (ver más arriba), y se incuban durante la noche a temperatura ambiente. Después del lavado (4 veces), se añaden 100 µl/pozo de IgG1 anti-humano de los MAb de ratón conjugados con biotina (dilución final 1/1000), IgG2 (dilución final 1/1000), IgG3 (dilución final 1/1000), IgG4 (dilución final 1/2000) o cadena ligera κ anti-humana (dilución final 1/1000) durante 4 h a temperatura ambiente. Como control se utiliza MAb específico de cadena ligera λ1 y λ2 anti-ratón de rata conjugado con biotina (dilución final 1/1000). Esto es seguido, como se describió previamente, por lavado y adición de estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (100 µl; dilución final 1/8000). Después de lavar (4 veces) se agrega el sustrato (p-nitrofenilfosfato en amortiguador de dietilamino; 100 µl). Las placas se leen después de 30 o 45 min dependiendo del desarrollo de la reacción, en un lector de microtitulación (Bio-Rad) utilizando filtros de 405 y 490 nm.

25 *ELISA para la detección de la producción de hUL-6:* Se recubren placas de microtitulación de ELISA con un MAb de ratón anti-hUL-6 (MAB206 de R&D System; 100 µl/pozo a razón de 4 µg/ml) en PBS / 0,02% de NaN₃ y se incuban durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se bloquean las placas de microtitulación con 300 µl de PBS / 2% de BSA / 0,02% de NaN₃ durante 2 h a 37°C. Se lavan luego las placas 4 veces con PBS / 0,05% de Tween 20 / 0,02% de NaN₃. Se agregan los sobrenadantes de cultivo de los fibroblastos de dermis humana (dilución final 1:3; 100 µl/pozo). Para establecer una curva de titulación, se titula hUL-6 (100 µl/pozo) desde 400 pg/ml hasta 3,1 pg/ml en etapas de dilución 1:2. Después de incubación durante la noche a temperatura ambiente, las placas se lavan 4 veces con PBS / 0,05% de Tween 20 / 0,02% de NaN₃. Se agrega un anticuerpo anti-hUL-6 de cabra conjugado con biotina (BAP206; R&D Systems) (25 ng/ml; 100 µl/pozo). Las muestras se dejan reaccionar durante 4 h a temperatura ambiente. Después de lavar (4 veces), se agrega estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina hasta una dilución final de 1/8000 (100 µl/pozo). Después de 40 minutos a temperatura ambiente, se lavan nuevamente las placas 4 veces y se agrega el sustrato (p-nitrofenilfosfato en amortiguador de dietilamino pH 9,8; 150 µl/pozo). Se leen las placas después de 30 min en un lector de microtitulación (Bio-Rad) utilizando filtros de 405 y 490 nm.

35
40 *Cálculos:* Los valores se reportan como valores O.D. originales o como el % de inhibición calculado sobre la media de valores por duplicado. Se reportan datos adicionales como la Media ± EEM. Se utilizó una curva estándar de hUL-6 para medir la concentración de hUL-6 en los sobrenadantes del cultivo utilizando un ajuste cúbico de la curva.

Resultados

45 Títulos de suero de ratón 27340:

Tabla 2. Títulos de suero anti-huL-17 (ratón 27340)
Dilución del suero
Valores de O. D. (media ± EEM)

Día	Lote HuL-17*	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
	E. coli	1.795 ± 0.022	1.524 ± 0.006	1.167 ± 0.015	0.854 ± 0.013	0.615 ± 0.005	0.378 ± 0.032		
35	HEK/EBNA	2.180 ± 0.041	1.875 ± 0.005	1.577 ± 0.047	1.313 ± 0.016	1.031 ± 0.011	0.728 ± 0.003		
99	E. coli		2.130 ± 0.078	1.913 ± 0.075	1.635 ± 0.041	1.494 ± 0.066	1.125 ± 0.001	0.810 ± 0.070	0.559 ± 0.021
	HEK/EBNA		2.029 ± 0.005	1.925 ± 0.030	1.716 ± 0.012	1.524 ± 0.004	1.259 ± 0.018	0.970 ± 0.036	0.706 ± 0.002

* Se recubren las placas de microtitulación con huL-17 (3 µg/ml) de E. coli (BM-E3141/98) o células HEK/EBNA (En.E-3382/82).

5 El suero de ratón 27340 se analiza en ELISA por la presencia de anticuerpos anti-huL-17 en los días 35 y 99 en dos preparaciones diferentes de huL-17 (Tabla 2). Los resultados muestran que los títulos del suero de ratón 27340 se incrementan aproximadamente cuatro veces entre el día 35 y el día 99 y que se reconocen ambas preparaciones de huL-17.

10 *Enlazamiento en ELISA de los sobrenadantes de hibridoma:* Se analizan 684 sobrenadantes en ELISA por la presencia de anticuerpos anti- huL-17, utilizando dos preparaciones de huL-17 recombinante, la primera a partir de E coli (BM-E3141/98) y la segunda a partir de células HEK/EBNA (En.E-3382/82). Se clasifican cincuenta y dos sobrenadantes como positivos respecto a la presencia de anticuerpos anti-huL-17 (Tabla 3). El enlazamiento preferencial con una o la otra preparación de huL-17 se observa en unos pocos casos. Se subrayan los 28 hibridomas que se clonan posteriormente.

Tabla 3. Reactividad por ELISA de los sobrenadantes de cultivo

Hibridoma (No)	HuL-17 lote* E. Coli Valores de O.D.	HEK/EBNA Valores de O.D.	Hibridoma (No)	HuL-17 lote* E. Coli Valores de O.D.	HEK/EBNA Valores de O.D.
1	<u>1.935/1.830</u>	<u>ND</u>	386	1.780/1.812	2.002/1.905
3	<u>1.928/1.928</u>	<u>2.026/1.956</u>	435	2.194/2.139	2.221/2.169
20	<u>1.386/1.471</u>	<u>2.099/2.042</u>	<u>439</u>	<u>1.180/1.236</u>	<u>1.442/1.470</u>

<u>59</u>	<u>1.917/2.078</u>	<u>2.342/2.384</u>	<u>444</u>	<u>1.034/1.066</u>	<u>1.166/1.138</u>
<u>66</u>	<u>1.629/1.619</u>	<u>ND</u>	<u>450</u>	<u>2.060/2.209</u>	<u>2.079/2.237</u>
<u>104</u>	<u>2.650/2.716</u>	<u>2.439/2.366</u>	<u>477</u>	<u>1.392/1.348</u>	<u>1.515/1.524</u>
<u>106</u>	<u>1.329/1.371</u>	<u>1.362/1.465</u>	496	2.131/2.078	2.569/2.798
<u>110</u>	<u>2.355/2.363</u>	<u>2.425/2.497</u>	<u>504</u>	<u>1.755/1.559</u>	<u>ND</u>
112	0.789/0.857	1.154/1.208	<u>543</u>	<u>2.332/2.455</u>	<u>2.370/2.381</u>
<u>116</u>	<u>1.656/1.652</u>	<u>ND</u>	<u>544</u>	<u>1.145/1.196</u>	<u>1.187/1.201</u>
128	1.244/1.669	0.714/0.695	548	0.728/0.750	0.891/0.909

(continuación)

Hibridoma (No)	HuL-17 lote* E. Coli Valores de O.D.	HEK/EBNA Valores de O.D.	Hibridoma (No)	HuL-17 lote* E. Coli Valores de O.D.	HEK/EBNA Valores de O.D.
<u>142</u>	<u>1.192/1.322</u>	<u>0.847/0.810</u>	552	0.824/0.811	0.969/0.943
<u>173</u>	<u>1.899/2.108</u>	<u>1.966/2.023</u>	<u>557</u>	<u>2.241/2.326</u>	<u>2.347/2.483</u>
182	0.948/0.903	0.874/0.866	564	0.628/0.675	0.808/0.820
190	2.249/2.084	2.150/2.139	566	1.092/1.068	1.239/1.152
196	1.406/1.305	1.797/1.752	577	1.018/0.928	1.226/1.206
216	1.120/1.146	1.114/1.128	<u>597</u>	<u>0.781/0.821</u>	<u>1.117/1.121</u>
<u>234</u>	<u>1.890/1.990</u>	<u>ND</u>	<u>612</u>	<u>1.935/1.777</u>	<u>2.033/1.989</u>
<u>277</u>	<u>1.674/1.640</u>	<u>ND</u>	<u>622</u>	<u>2.121/2.230</u>	<u>2.592/2.277</u>
285	0.678/0.789	0.735/0.784	<u>627</u>	<u>1.000/1.077</u>	<u>1.203/1.209</u>
298	2.475/2.677	2.340/2.358	649	1.335/1.389	1.311/1.337
<u>305</u>	<u>1.721/1.789</u>	<u>0.602/0.634</u>	<u>658</u>	<u>1.218/1.297</u>	<u>1.415/1.437</u>
319	1.111/1.073	1.223/1.202	674	1.112/1.087	1.134/1.127
328	1.738/1.762	1.869/1.835	686	1.447/1.549	1.730/1.646
<u>343</u>	<u>2.478/2.702</u>	<u>2.302/2.448</u>	705	1.899/1.803	1.899/1.803
373	1.200/1.194	1.212/1.233	720	2.249/2.420	2.383/2.385

*Se recubren placas con huL-17 recombinante (3 µg/ml) de E. coli (BM-E3141/98) o células HEK/EBNA (En.E-3382/82). Los sobrenadantes se prueban en la dilución final de 1/3.

5

Enlazamiento en ELISA de los sobrenadantes del cultivo de los clones de hibridoma: La reactividad en ELISA de los sobrenadantes de los clones de los 11 hibridomas, que retienen la mejor producción del MAb anti-huL-17, se muestra en la Tabla 4. Los clones, resaltados en negrilla, se seleccionaron para producir ~ 1 litro de sobrenadante en botellas de rodillo para la purificación y análisis de los anticuerpos. Con la excepción de los clones derivados del

10

hibridoma No 5, que producen un anticuerpo huIgG3κ, todos los otros clones producen MAb huIgG1κ, cuando se evalúan mediante anticuerpos monoclonales específicos del isotipo.

5

Tabla 4. Reactividad por ELISA de los sobrenadantes del cultivo para hu-IL-17.

Clon (No)	Sobrenadantes* Valores O.D.	Clon (No)	Sobrenadantes* Valores O.D.	Clon (No)	Sobrenadantes* Valores O.D.
3-2	2.198/1.940	<u>106-1</u>	<u>1.244/1.306</u>	<u>543-4</u>	<u>1.003/0.913</u>
<u>3-20</u>	<u>1.909/1.939</u>	106.2	1.203/1.138	543-16	0.795/0.717
3-21	1.873/1.812	106-3	1.176/1.166	557-6	0.879/0.940
5-18	1.240/1.168	110-7	1.535/1.393	557-36	0.980/0.925
5-22	1.340/1.396	<u>110-28</u>	<u>1.376/1.370</u>	557-37	1.104/1.109
5.29	1.316/1.354	305-21	1.484/1.518	<u>622-2</u>	<u>0.923/0.894</u>
5.31	1.227/1.302	<u>305-38</u>	<u>1.669/1.858</u>	622-5	1.070/1.032
<u>5-40</u>	<u>1.364/1.543</u>	<u>343-1</u>	<u>1.351/1.375</u>	622-6	0.980/0.953
104-2	1.385/1.299	439-80	2.506/2.543	658-2	0.744/0.744
104-4	1.085/1.044	450-13	1.568/1.610	658-6	0.769/0.772
104-9	1.488/1.304	<u>450-23</u>	<u>1.658/1.667</u>	<u>658-16</u>	<u>0.741/0.758</u>
<u>104-11</u>	<u>1.670/1.380</u>	543-1	1.074/0.991		

Se recubren placas de microtitulación con huIL-17 recombinante (3 µg/ml) de células HEK/EBNA (En.E-3382/82).

10 *Actividad neutralizante de los sobrenadantes del cultivo:* Los sobrenadantes del cultivo se analizan para la inhibición de la producción de huIL-6 mediante fibroblastos de dermis humana estimulados con huIL-17 recombinante. Como se muestra en la Tabla 5, la mayor parte de los sobrenadantes del cultivo muestran actividad inhibitoria.

15 Tabla 5. Inhibición de la producción de IL-6 inducida por huIL-17 en fibroblastos de dermis humana mediante el cultivo de sobrenadantes
Inhibición de la producción de IL-6 (%)

Clon (No)	Cantidad de huIL-17 utilizado como estímulo (ng/ ml)			
	62.5	125	250	500
3-20	86.3	75.0	33.1	23.2
5-40	23.3	41.4	20.3	19.0
104-11	47.7	48.5	22.2	16.3
106.1	61.6	19.8	5.7	9.8
110-28	99.8	92.5	88.6	61.3
305-38	47.2	47.1	36.6	23.7

343-1	96.8	102.4	90.5	66.4
450-23	51.7	48.5	47.5	26.6
543.4	-6.0	-12.0	-6.5	-7.1
622-2	34.0	23.2	20.3	18.4
658-16	34.4	27.7	12.7	18.8

5 *Actividad neutralizante de AIN45*: La selección del clon 110-28 para la producción del candidato de desarrollo AIN457 (forma de realización preferida de la invención) se basa en la actividad neutralizante y la medición de afinidad en un BIACORE 2000 de los anticuerpos purificados (véase a continuación en el Ejemplo 2).

10 **Ejemplo 2:** AIN457 se enlaza con muy alta afinidad con la IL-17 humana recombinante (hulL-17); el K_D es 122 ± 22 pM (BIAcore) y neutraliza la producción de IL-6 humana inducida por hulL-17 en fibroblastos dérmicos humanos; el IC_{50} es de $2,1 \pm 0,1$ nM en una concentración de 1,87 nM de hulL-17

a) Métodos

15 **Reactivos:** Los reactivos generales de laboratorio se adquirieron a través de Merck o Sigma y son del grado de pureza más alto disponible; las fuentes de reactivos especiales se detallan más adelante.

20 **Proteínas:** Se generan anticuerpos monoclonales mediante la inmunización de ratones transgénicos MEDAREX con la IL-17 humana recombinante, y luego se sigue el procedimiento estándar para producir las líneas celulares, a partir de las cuales se puede purificar el material secretado mediante cromatografía en Sefarosa de Proteína A (esencialmente como se describe en el Ejemplo 1). El AIN457 se almacena como una solución filtrada en forma estéril en citrato de Na 50 mM, pH 7,0, NaCl 140 mM a 4°C. El AIN457 humano recombinante (lote KB03303A) se obtiene en una solución madre estéril 20 mM de citrato de Na / 40 mM de amortiguador de fosfato, pH 7, 150 mM de NaCl o 20 mM de ácido acético pH 5,5 ajustado con Base Tris 1 M. Las concentraciones están usualmente en el rango de 2 mg/ml y se diluyen hasta una concentración final de 5 µg/ml en amortiguador BIA (HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,05% v/v de Tween-20) para los experimentos con BIAcore.

La IL-17 humana recombinante es de producción propia; lote En/E 3882/83; 0,29 mg/ml.

Mediciones con BIAcore

30 La determinación de los parámetros cinéticos de enlazamiento y los niveles de reactividad cruzada se hacen mediante mediciones de resonancia de plasmón de superficie utilizando el biosensor óptico BIAcore 2000 (BIAcore AB, Upsala, Suecia, véase Lit. HS 1,2 para detalles). Esta tecnología permite la determinación libre de marcadores de las constantes de velocidad microscópica para el enlazamiento ($k_{\text{encendido}}$) y disociación (k_{apagado}) de un ligando con un receptor. Por lo tanto, es especialmente adecuado para caracterizar las interacciones anticuerpo-antígeno. Esta tecnología complementa y es en muchos aspectos superior a las mediciones por ELISA (Van Regenmortel, Dev Biol (Basel). 2003; 112: 141 - 51). Los estudios de enlazamiento del IL-17 recombinante con el anticuerpo IL-17 AIN457 se llevan a cabo en dos formas. En el protocolo estándar, se captura el AIN457 mediante un anticuerpo Fcy anti-humano (Jackson Immunochemicals; Cat. No. 109-005-098) que se inmoviliza previamente en un chip sensor CM-5 BIAcore (grado Investigación). El enlazamiento covalente del anticuerpo de captura Fcy se hace con el 'kit de acoplamiento de Amina' proporcionado por BIAcore (BIAcore, Cat. No. BR-1000-50). Típicamente, 3000 RU del anticuerpo de captura se adhieren a la superficie de dextrano activada con una solución de anticuerpo anti Fcy de 30 µg/ml en amortiguador Ac 10 mM, pH 4,5 con una velocidad de flujo de 5 µl/min que conduce aproximadamente a 250 RU de inmovilización de AIN457. Como una pauta, 1000 RU corresponden a una transferencia de masa de 1 ng/mm². Alternativamente, IL-17 (Sección 3.2; Tabla 4), el anticuerpo AIN457 se acopla directamente a la superficie del chip sin el anticuerpo de captura. Los resultados se comparan con el protocolo descrito en la Tabla 9 (véase más adelante).

b) Resultados

Cinéticas de enlazamiento del complejo IL-17 / AIN457

55 La constante de disociación de equilibrio K_D permite hacer algún juicio acerca de la estabilidad de los complejos, una vez formados *in vivo*. Por lo tanto, hemos determinado las constantes cinéticas para el enlazamiento de la IL-17 humana con el anticuerpo AIN457 inmovilizado, y hemos derivado la K_D para el proceso a partir de estos datos. La Tabla 3 muestra el resumen de los datos obtenidos cuando se ajustan las curvas de 2 experimentos al modelo Langmuir utilizando el software BIAevaluation 3.0. Aunque el anticuerpo es, por supuesto, bivalente, el enlazamiento

se puede tratar como un evento 1:1, con los sitios de enlazamiento de anticuerpos individuales exhibidos en la superficie que llegan a ser ocupados por las moléculas IL-17 monoméricas.

5 Este experimento muestra, tanto la asociación extremadamente rápida así como también las cinéticas de disociación muy lentas del complejo anticuerpo-quimiocina. Se obtiene un mejor ajuste datos cuando se tratan los sensogramas individualmente (en vez de globalmente, como se sugiere en la BIAevaluation). Por lo tanto, después de combinar las series de titulación se obtienen valores promedio de 12 sensogramas de $k_{\text{encendido}} = (4,1 \pm 0,1) \times 10^5$ 1/M s; $k_{\text{apagado}} = (3,8 \pm 0,5) \times 10^{-4}$ 1/s; y para $K_D = 122 \pm 22$ pM.

10

Tabla 3.

Constantes cinéticas para el enlazamiento 1:1 de la IL-17 humana rec con NVP-AIN457

Conc [nM]	Kencendido [1/Ms]	Kapagado [1/s]	KD [M]	Ej. IL-314
2	3.31E+05	3.36E-05	1.02E-10	Corrida 1
4	1.28E+05	3.78E-05	2.95E-10	
8	3.79E+05	1.86E-05	4.90E-11	
12	3.60E+05	3.00E-05	8.33E-11	
16	3.52E+05	5.70E-05	1.62E-10	
20	3.52E+05	4.15E-05	1.18E-10	
2	1.23E+06	1.97E-05	1.60E-11	Corrida 2
4	4.11E+05	1.20E-05	2.92E-11	
8	3.78E+05	4.54E-05	1.20E-10	
12	3.46E+05	5.13E-05	1.48E-10	
16	3.17E+05	5.95E-05	1.88E-10	
20	3.34E+05	5.01E-05	1.50E-10	
Media	4.10E+05	3.80E-05	1.22E-10	n=12
EEM	7.73E+04	4.51E-06	2.21E-11	

KD media calculada a partir de entradas individuales (verticalmente), en vez de aplicar la ecuación $K_D = k_{\text{ap}}/k_{\text{en}}$

15

Para el AIN457 producido en células recombinantes (KB03303A) se realizan mediciones de afinidad para las citoquinas IL-17 de hombre, tití, mono Rhesus y mono cynomolgus, respectivamente. Los detalles experimentales de las mediciones Biacore son iguales a las descritas anteriormente para el anticuerpo MAB110-28. Se realizan dos ensayos de corridas independientes de 6 concentraciones de IL-17 en cada corrida. Las concentraciones para la IL-17 humana son 2, 4, 8, 12, 16, 20 nM y 10, 20, 30, 40, 50, 60 nM para todas las otras especies. El análisis de los datos completos produce n = 12 mediciones individuales para cada especie de IL-17. Se reporta la K_D así como también EEM.

20

Tabla 4. Resumen: Constantes cinéticas para el enlazamiento 1:1 de IL-17 humana rec, tití, mono Rhesus y cinomólogo con NVP-AIN457 (KB03303A)

Especie	Media de KD [M]	EEM
Humana	0,227 nM	+/- 0,03 nM
Tití	1,2 nM	+/- 0,1 nM
Mono Rhesus	9 nM	+/- 1 nM
Mono Cinomólogo	6 nM	+/- 0,7 nM

25

ES 2 487 533 T3

Un conjunto completo de datos del análisis BIAcore para el anticuerpo KB03303A con $k_{\text{encendido}}$, k_{apagado} y K_D y las especies IL-17 respectivas se presentan más adelante en las tablas 5 a 8.

Tabla 5. Constantes cinéticas para el enlazamiento 1:1 de la IL-17 humana rec con AIN457 (KB03303A)

Conc [nM]	$k_{\text{encendido}}$ [1/Ms]	k_{apagado} [1/s]	K_D [M]	Ej. IL-366/ IL-365
2	3.37E+05	6.43E-05	1.91E-10	Corrida 1
4	2.59E+05	7.76E-05	2.99E-10	
8	2.12E+05	5.21E-05	2.46E-10	
12	2.18E+05	7.38E-05	3.38E-10	
16	2.02E+05	7.15E-05	3.54E-10	
20	1.92E+05	8.04E-05	4.20E-10	
2	5.50E+05	7.01E-05	1.27E-10	Corrida 2
4	3.22E+05	3.30E-05	1.02E-10	
8	2.85E+05	4.73E-05	1.66E-10	
12	2.86E+05	4.84E-05	1.69E-10	
16	2.61E+05	3.09E-05	1.18E-10	
20	2.58E+05	4.90E-05	1.90E-10	
Media	2.82E+05	5.82E-05	2.27E-10	n=12
EEM	2.77E+04	4.91E-06	3.00E-11	

ES 2 487 533 T3

Tabla 6. Constantes cinéticas para el enlazamiento 1:1 de IL-17 de tití rec con AIN457 (KB03303A)

Conc [nM]	Kencendido [l/Ms]	Kapagado [1/s]	KD [M]	Ej. IL-366/ IL-365
10nM	8.89E+04	7.96E-05	8.95E-10	Corrida 1
20nM	1.11E+05	8.69E-05	7.82E-10	
30nM	9.82E+04	1.15E-04	1.17E-09	
40nM	9.92E+04	1.16E-04	1.17E-09	
50nM	9.81E+04	1.19E-04	1.21E-09	
10nM	8.83E+04	9.98E-05	1.13E-09	Corrida 2
20nM	1.10E+05	1.28E-04	1.17E-09	
30nM	9.70E+04	1.52E-04	1.57E-09	
40nM,	9.66E+04	1.31E-04	1.36E-09	
50nM	9.52E+04	1.59E-04	1.67E-09	
Media	9.83E+04	1.19E-04	1.21E-09	n=10
EEM	2.36E+03	8.09E-06	±0.1	

ES 2 487 533 T3

Tabla 7. Constantes cinéticas para el enlazamiento 1:1 de IL-17 de mono Rhesus rec con AIN457 (KB03303A)

Conc [nM]	Kencendido [1/Ms]	Kapagado [1/s]	KD [M]	Ej. IL-366/ IL-365
10	1.70E+05	3.89E-04	2.28E-09	Corrida 1
20	6.73E+04	4.94E-04	7.34E-09	
30	5.86E+04	3.54E-04	6.04E-09	
40	3.27E+04	4.05E-04	1.24E-08	
50	4.05E+04	4.55E-04	1.12E-08	
60	3.50E+04	4.60E-04	1.31E-08	
10	5.47E+04	3.85E-04	7.04E-09	Corrida 2
20	4.62E+04	2.74E-04	5.93E-09	
30	4.30E+04	3.51E-04	8.16E-09	
40	3.76E+04	3.66E-04	9.74E-09	
50	3.60E+04	4.32E-04	1.20E-08	
60	3.44E+04	4.24E-04	1.23E-08	
Media	5.47E+04	3.99E-04	8.96E-09	n=12
EEM	1.09E+04	1.72E-05	9.70E-10	

Tabla 8. Constantes cinéticas para el enlazamiento 1:1 de IL-17 de mono cinomólogo rec con AIN457 (KB03303A)

Conc [nM]	Kencendido [1/Ms]	Kapagado [1/s]	KD [M]	Ej. IL-366/ IL-365
5nM	3.27E+05	3.60E-04	1.10E-09	Corrida 1
10nM	1.79E+05	4.02E-04	2.24E-09	
15nM	1.03E+05	5.67E-04	5.50E-09	
20nM	1.10E+05	5.23E-04	4.75E-09	
25nM	9.23E+04	5.78E-04	6.26E-09	
30nM	9.05E+04	7.14E-04	7.89E-09	
5nM	7.18E+04	5.08E-04	7.08E-09	Corrida 2
10nM	9.70E+04	6.69E-04	6.90E-09	
15nM	1.03E+05	7.66E-04	7.41E-09	
20nM	1.02E+05	7.32E-04	7.17E-09	

(continuación)

Conc [nM]	Kencendido [I/Ms]	Kapagado [1/s]	KD [M]	Ej. IL-366/ IL-365
25nM	1.02E+05	7.47E-04	7.34E-09	
30nM	1.00E+05	8.34E-04	8.32E-09	
Media	1.23E+05	6.17E-04	6.00E-09	n=10
EEM	1.99E+04	4.34E-05	6.52E-10	

5 Posteriormente, se evalúa la actividad inhibitoria de AIN457 purificado (Lote En/E-10333/53; 0,54 mg/ml) sobre huLL-17. Los valores de IC₅₀ se muestran en la Tabla 6. En estos experimentos, se incluyen huLL-17R/Fc y un MAb anti-huLL-17 de ratón como controles positivos y Simulect como control negativo.

10 Tabla 9. Neutralización de hu-IL-17 mediante el MAb AIN457 anti-huLL-17 humano en comparación con IL-17R/Fc, y un MAb anti-huLL-17 de ratón (R&D System).

	AIN457 IC ₅₀ ± EEM (n = 3*)	IL-17 R/Fc IC ₅₀ ± EEM (n = 3)	MAB 317 IC ₅₀ ± EEM (n = 3)
huLL-17 @ 1,87 nM (30 ng/ ml)	2,071 ± 0,116 nM	1,713 ± 0,305 nM	12,226 ± 2,050 nM

* La media y el EEM se calculan a partir de tres experimentos diferentes e independientes

15 En conclusión, el AIN457 anula la secreción dependiente de IL-17 de huLL-6 mediante fibroblastos de dermis humana. La potencia es comparable con aquella de huLL-17R/Fc y superior a aquella de un MAb anti-huLL-17 de ratón comercialmente disponible. Es interesante notar que se observa una inhibición más completa con AIN457 que con IL-17R/Fc.

20 **Ejemplo 3:** Pureza y secuencias parciales de aminoácidos del secuenciamiento de la secuenciación de aminoácidos de cadena ligera y pesada

25 *Secuencias de aminoácidos del terminal amino de las regiones V_L y V_H:* Los primeros 48 residuos de aminoácidos de la cadena ligera y pesada para dos anticuerpos anti-IL-17A, el clon 110-7 (véase la tabla 4) y 110-28 (véase la tabla 4), se determinan mediante degradación de Edman. La secuencia de aminoácidos es idéntica para ambos clones. Se busca en el GenBank mediante análisis Blast y se utiliza la secuencia de ADN más homóloga encontrada para diseñar los cebadores de clonación.

30 Clonación molecular de las regiones V_L y V_H: Se prepara ARN total de 2 x 10⁷ células de hibridoma (clon 110-7, clon 110-28) con el kit ARNeasy Midi de acuerdo con el protocolo del vendedor (Quiagen Hilden, Alemania). Se eluye el ARN total en 200 µl de agua libre de ARNasa y se almacena a -80°C. La síntesis de ADNc monocatenario se lleva a cabo con transcriptasa inversa M-MLV (Promega, Madison, WI), cebador oligo-dT, mezcla de nucleótidos de PCR (dNTP) e inhibidor de ARNsin (Roche, Mannheim). Se mezclan 5 µg de ARN total con 1 µl del cebador oligo-dT (0,5 µg/µl), y se agrega agua libre de ARNasa hasta un volumen final de 36 µl. La mezcla se incuba a 70°C durante 10 minutos y luego se almacena sobre hielo. Mientras está sobre hielo, se agregan los siguientes reactivos: 10 µl 5x de amortiguador a RT, 2 µl de los dNTP (10 mM cada uno), 2 µl de ARNsin y 1 µl de transcriptasa inversa M-MLV. La reacción se lleva a cabo a 42°C durante 1 hora.

35 La reacción PCR se ensambla utilizando 4 µl de la plantilla de ADNc, 2 µl de cada cebador a razón de 10 µM cada uno (ver más adelante y las Tablas 10 y 11 para una visión de conjunto), 20 µl de 2x Qiamix (que contiene amortiguador, dNTP, Taq Polimerasa) y 1 µl de ADN polimerasa de Pwo en un volumen total de 40 µl. Las condiciones PCR se fijan para 35 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 20 segundos y 72°C durante 30 segundos. El producto PCR se subclona en el vector de clonación pCR4-TOPO-Zero (Stratagene, La Jolla, CA). Se recogen varios clones de cada reacción y se determina la secuencia de nucleótidos mediante Solvias AG (Basilea), utilizando los cebadores MV432 (SEQ ID NO: 21), MV433 (SEQ ID NO: 22), MV434 (SEQ ID NO: 23), MV435 (SEQ ID NO: 14), y los cebadores estándar en el ADN del vector.

40 El ADNc que codifica la cadena pesada se amplifica utilizando el par de cebadores MV416 (SEQ ID NO: 15) / # 265 (SEQ ID NO: 16) y MV418 (SEQ ID NO: 17) / # 265 (SEQ ID NO: 16). Los cebadores cubren las secuencias de nucleótidos que corresponden a las siguientes posiciones de aminoácidos de la cadena pesada: MV416 posición -19 / -13 (péptido de señal); MV418 posición +1 / +7; posición # 265 +253 / +259. La posición +1 es el primer aminoácido de la proteína madura.

5 El ADNc que codifica la cadena ligera se amplifica utilizando el par de cebadores MV417 (SEQ ID NO: 18) / # 223 (SEQ ID NO: 19) y MV419 (SEQ ID NO: 20) / # 223 (SEQ ID NO: 19). Los cebadores cubren las secuencias de nucleótidos que corresponden a las siguientes posiciones de aminoácidos de la cadena ligera: MV417 posiciones -20 / -14 (péptido de señal); MV419 posición +1 / +7; posición # 223 +210 / +215. Este enfoque permite hacer dos amplificaciones independientes de PCR para cada cadena de inmunoglobulina, que resulta en dos secuencias de ADN independientemente establecidas.

Resultados y Discusión

10 Los productos PCR clonados que codifican para la cadena ligera y la cadena pesada de dos hibridomas (110-7 y 110-28, véase la tabla 4 anterior) se caracterizan por la secuenciación de ADN. Se utilizan cinco y seis secuencias independientes para ensamblar las secuencias de cadena pesada y de cadena ligera. Los ADNc de cadena ligera son todos idénticos y cubren la secuencia entera de codificación (posición del aminoácido -20 a +215). Los ADNc de cadena pesada tienen 2 emparejamiento incorrectos en un ADNc cada uno. Estos se excluyen de la
 15 secuencia final, que se extiende desde el codón de inicio hasta el extremo de la región de bisagra después del dominio constante 1 (posición del aminoácido -19 a +238). Las secuencias para ambos hibridomas son idénticas. Se selecciona el ADNc obtenido del hibridoma 110-28 y se utiliza para todo el trabajo de expresión adicional. La SEQ ID NO: 7 (ADNc de la cadena pesada de AIN457), SEQ ID NO: 8 (secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de AIN457), SEQ ID NO: 9 (ADNc de la cadena ligera de AIN457) y SEQ ID NO: 10 (secuencia de aminoácidos de
 20 AIN457) muestran la secuencia de ADN que codifica para la cadena ligera y la cadena pesada de AIN457, junto con la secuencia de proteína y la posición de los cebadores utilizados para la amplificación PCR y el secuenciamiento de ADN. Las secuencias de ADN han sido registradas en PlasNova, número de acceso NPLOO3689 para la cadena pesada, y número de acceso NPLOO3690 para la cadena ligera.

25 La secuencia de aminoácidos encontrada mediante la clonación de ADNc es idéntica a aquella obtenida previamente por la degradación de Edman de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina purificada, lo que indica que se ha clonado el ADNc correcto.

30 Tabla 10: Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera

La secuencia de aminoácidos que codifica para el dominio variable se encuentra en negrilla y subrayada. Se indican los cebadores de oligonucleótido utilizados para clonación (subrayados).

```

MV417 ACCATGGAAACCCCAGCGGAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACC
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TGGTACCTTTGGGGTCGCCTCGAAGAGAAGGAGGACGATGAGACCGAGGGTCTATGGTGG

T M E T P A E L L F L L L L W L P D T T -

MV419 GGAGAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGAAAGAGCC
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CCTCTTTAACACAACACTGCGTCAGAGGTCGTCGAGAAACAGAGGTCCCCTTTCTCGG

G E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A -

ACCCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
TGGGAGAGGACGTCCCGGTCAGTCTCACAAATCGTCGTCGATGAATCGGACCATGGTTCGT

T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q -

AAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TTTGGACCGGTCCGAGGGTCCGAGGAGTAGATACCACGTAGGTCGTCCCGGTGACCGTAG

K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I -
    
```

ES 2 487 533 T3

CCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
GGTCTGTCCAAGTCACCGTCACCCAGACCCTGTCTGAAGTGAGAGTGGTAGTCGTCTGAC
P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L -

GAGCCTGAAGATTTTCAGTGTATTACTGTTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGTGCACCTTC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CTCGGACTTCTAAAACGTACATAATGACAGTCGTATACCATCGAGTGGAGCGTGAAG
E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P C T F -

GGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
CCGGTTCCTGTGTGCTGACCTCTAATTTGCTTGACACCGACGTGGTAGACAGAAGTAGAAG
G Q G T R L E I K R T V A A P S V F I F -

CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAAC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
GGCGGTAGACTACTCGTCAACTTTAGACCTTGACGGAGACAACACACGGACGACTTATTG
P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N -

TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
AAGATAGGGTCTCTCCGGTTTCATGTACCTTCCACCTATTGCGGGAGGTTAGCCCATG
F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N -

TCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
AGGGTCCTCTCACAGTGTCTGCTCCTGTCTGCTGCTGCGTGGATGTCGGAGTCGTGCTG
S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T -

CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
GACTGCGACTCGTTTCGTCTGATGCTCTTTGTGTTTCAGATGCGGACGCTTCAGTGGGTA
L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H -

CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 711
#223 GTCCCGGACTCGAGCGGGCAGTGTTCCTCGAAGTTGTCGCCCTCTCACAATC
Q G L S S P V T K S F N R G E C * -

ES 2 487 533 T3

Tabla 11. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena pesada

La secuencia de aminoácidos que codifica para el dominio variable se encuentra en negrilla y subrayada. Se indican los cebadores de oligonucleótido utilizados para la clonación y el secuenciamiento (subrayados).

MV416 ACCATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTCCTTGTGCTATTTTAGAAGGTGTCCACTGT
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 TGGTACCTTAACCCCGACTCGACCCAAAAGGAACAACGATAAAATCTTCACAGGTGACA
 T M E L G L S W V F L V A I L E G V H C -

MV418 GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 CTCCAGTCAACCACCTCAGACCCCTCCGAACCAGGTCCGACCCCCAGGGACTCTGAG
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L -

TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAACTATTGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCT
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 AGGACACGTCCGAGACCTAAGTGGAATCATTTGATAACCTACTTGACCCAGGCGGTCCGA
 S C A A S G F T F S N Y W M N W V R Q A -

CCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCGCCATAAACCAAGATGGAAGTGAGAAATACTAT
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 GGTCCCTTTCCCGACCTCACCCACGGCGGTATTTGGTTCTACCTTCACTCTTTATGATA
 P G K G L E W V A A I N Q D G S E K Y Y -

GTGGGCTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTAT
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 CACCCGAGACACTTCCCGGCTAAGTGGTAGAGGTCTCTGTTGCGGTTCTTGAGTGACATA
 V G S V K G R F T I S R D N A K N S L Y -

MV432 CTGCAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGGGACTAT
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 GACGTTTACTTGTCCGACTCTCAGCTCCTGTGCCGACACATAATGACACACTCCCTGATA
 L Q M N S L R V E D T A V Y Y C V R D Y -

TACGATATTTGACCGATTATTACATCCACTATTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGC

ES 2 487 533 T3

361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
ATGCTATAAACTGGCTAATAATGTAGGTGATAACCATGAAGCTAGAGACCCCGGCACCG
Y D I L T D Y Y I H Y W Y F D L W G R G -

MV433 ACCCTGGTCACTGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
MV434 TGGGACCAGTGACAGAGGAGTCCGAGGTGGTCCCGGTAGCCAGAAGGGGGACCCTGGG
T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P -

TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
AGGAGGTTCCTCGTGGAGACCCCGTGTGCGCCGGGACCCGACGGACCAGTTCCTGATGAAG
S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F -

CCCGAAQCGGTGACGCTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
GGGCTTGGCCACTGCCACAGCACCTTGAGTCCGCGGGACTGGTCCCGCACGTGTGGAAG
P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F -

CCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
GGCCGACAGGATGTCAGGAGTCTGAGATGAGGGAGTTCGTCCGACCACTGGCACGGGAGG
P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S -

AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCAGCAACCAAG
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
MV435 TCGTCGAACCCGTGGGTCTGGATGTAGACGTTGCACTTAGTGTTCGGGTCGTTGTGGTTC
S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K -

GTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGCCCA
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
#265 CACCTGTTCTCTCAACTCGGGTTTAGAACACTGTTTTGAGTGTGTACGGGTGGCACGGT
V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P -

TAA
781 --- 783
ATT
*

Ejemplo 4: Estructura tridimensional del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal IL-17 anti humano AIN457

Con el fin de determinar la conformación de las regiones determinantes de complementariedad (las CDR) y la estructura del sitio de enlazamiento del antígeno de AIN457, se genera el fragmento Fab, se cristaliza y se determina su estructura por rayos X mediante cristalografía de proteína.

Método: El fragmento Fab de NVP-AIN457 se produce mediante escisión de papaína del anticuerpo completo y se purifica mediante cromatografía de proteína A seguido por cromatografía de exclusión por tamaño. El material purificado luego se concentra mediante ultrafiltración hasta 20 mg/ml en Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 25 mM, TCEP 5 mM. Los cristales se hacen crecer mediante la técnica de difusión de vapor en gotas que cuelgan a 19°C, de sulfato de amonio 2,0 M, 5% de PEG 400, Na MES 0,1 M pH 6,5. Ellas están en un grupo espacial P₂₁2₁2₁ con dimensiones de celdas unitarias a = 90,3 Å, b = 106,7 Å, c = 131,4 Å y 2 moléculas Fab por unidad asimétrica. Antes de la recolección de datos de rayos X, se entrecruza un cristal único de AIN457 con glutaraldehído utilizando el método de Lusty (J. Appl. Cryst. (1999) 32, 106 - 112) y luego se transfiere a una solución que contiene Li₂SO₄ 2,0 M, 2% de PEG 400, y Na MES 0,1 M pH 6,5. Se monta posteriormente el cristal en un bucle de congelación y se congela instantáneamente para la recolección de datos a 95 K. Se registran cada una de las 180 imágenes de difracción que corresponden a una oscilación de 1,0 grados. Los datos de difracción se procesan con la suite de programa HKL. La estructura se determina con una resolución de 2,5 Å mediante reemplazo molecular. La estructura se refina luego mediante dinámicas de ángulo de torsión y minimización de la energía utilizando el programa CNX.

Resultados: Dos moléculas Fab de AIN457 están presentes en la unidad asimétrica del cristal, con el bucle H-CDR3 de ambas moléculas Fab involucradas en los contactos proteína-proteína con el bucle H-CDR3 de los Fab relacionados con simetría. Las dos moléculas Fab muestran diferentes ángulos de codo pero tienen más bien conformaciones de bucle CDR esencialmente idénticas (véase la Tabla 12 para la secuencia de aminoácidos de los bucles CDR). El bucle H-CDR1 adopta la estructura canónica H1:1 esperada, aunque la conformación del bucle H-CDR2 coincide con aquella de la estructura canónica H2:3A. El bucle H-CDR3 del anticuerpo AIN457 es excepcionalmente largo, comprende 18 residuos entre las posiciones 94 de Kabat (Arg H98) y 101 (Asp H115). Este muestra la estructura típica de tronco abultado estabilizada mediante un puente salino entre la cadena lateral de Arg en la posición 94 (Arg H98) y el grupo carboxilato de Asp en la posición H101 (Asp H115), y mediante una interacción de enlace de H entre la cadena lateral de Trp H117 y el grupo carbonilo de cadena principal de Phe H114. La cabeza del bucle H-CDR3 tiene la estructura de una horquilla beta trenzada larga con una segunda protuberancia beta en su base y una curva beta tipo I' en su vértice. Una característica notable del bucle H-CDR3 de AIN457 es su muy alto contenido en residuos aromáticos: 6 tirosinas, 2 triptófanos, 1 fenilalanina. Debido a que todos los otros bucles CDR contribuyen cada uno con 1 tirosina más, el sitio de combinación del antígeno de AIN457 posee 11 tirosinas en total. Las conformaciones de los bucles L-CDR1 y L-CDR2 corresponden a las estructuras canónicas L1:6 y L2:1, respectivamente. En contraste con H-CDR3, el bucle L-CDR3 es corto (6 residuos) y muestra la estructura canónica comúnmente observada L3:1, con una cis-prolina en su punta (Pro L96), una glutamina en la posición 90 de Kabat (Gln L91) y una treonina en la posición 97 de Kabat (Thr L98). Sin embargo, una característica muy inusual del bucle L-CDR3 de AIN457 es la presencia de un residuo cisteína después de la cis-prolina (Cys L97). La cadena lateral de Cys L97 está en la parte inferior de una depresión poco profunda ubicada en la interfaz V_L-V_H y alineada por los residuos Trp H112, Trp H47 y Tyr L92.

Tabla 12:

Cadena ligera		
O L-CDR1	Definición de Kabat	R-A-S-Q-S-V-S-S-S-Y-L-A
	Definición de Chothia/ rayos X	R-A- S-Q-S-V-S-S-S -Y-L-A
O L-CDR2	Definición de Kabat	G-A-S-S-R-A-T
	Definición de Chothia/ rayos X	G-A-S-S-R-A-T
O L-CDR3	Definición de Kabat	Q-Q-Y-G-S-S-P-C-T
	Definición de Chothia/ rayos X	Q-Q- Y-G-S-S-P-C-T
Cadena pesada		
O H-CDR1	Definición de Kabat	N-Y-W-M-N
	Definición de Chothia/ rayos X	G-F-T-F-S-N-Y-W-M-N
O H-CDR2	Definición de Kabat	A-I-N-Q-D-G-S-E-K-Y-Y-V-G-S-V-K-G
	Definición de Chothia/ rayos X	A-I- N-Q-D-G-S-E-K-Y-Y
O H-CDR3	Definición de Kabat	D-Y-Y-D-I-L-T-D-Y-Y-I-H-Y-W-Y-F-D-L
	Definición de Chothia/ rayos X	C-V-R- D-Y-Y-D-I-L-T-D-Y-Y-I-H-Y-W-Y-F-D-L-W-G

Tabla 1: Las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables de los anticuerpos monoclonales AIN457, con base en la definición de Kabat y como se determina por el análisis de rayos X, utilizando el enfoque de Chothia y colaboradores. Los aminoácidos resaltados en negrilla son parte de los bucles CDR, mientras que aquellos mostrados en el estilo llano son parte de la estructura del anticuerpo.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG

5 <120> Compuesto Orgánico

<130> 4-33392P1

<160> 23

10 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 5

15 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> región CDR1 de AIN457

20 <220>

<221> DOMINIO

<222> (1) .. (5)

<223> CDR1 = región hipervariable 1 de la cadena pesada de AIN457

25 <400> 1

Asn Tyr Trp Met Asn

1

5

30 <210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

35 <220>

<223> CDR2 de AIN457

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(17)

<223> CDR2 = región hipervariable 2 de la cadena pesada de AI N457

40 <400> 2

Ala Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Gly Ser Val Lys

1

5

10

15

45 **Gly**

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

50 <213> artificial

<220>

<223> CDR3 de AIN457

55 <220>

<221> DOMINIO

ES 2 487 533 T3

<222> (1) .. (18)

<223> CDR3 = región hipervariable 3 de la cadena pesada de AI N457

<400> 3

5

Asp Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Ile His Tyr Trp Tyr Phe
1 5 10 15

Asp Leu

<210> 4

<211> 12

10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

15

<223> CDR1' de AIN457

<220>

<221> DOMINIO

20

<222> (1) .. (12)

<223> CDR1' = región hipervariable 1 de cadena ligera de AIN457

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

25

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

30

<220>

<223> CDR2' de AIN457

<220>

35

<221> DOMINIO

<222> (1) .. (7)

<223> CDR2' = región hipervariable 2 de cadena ligera AIN457

<400> 5

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

40

1

5

<210> 6

<211> 9

45

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> CDR3' de AIN457

50

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1) .. (9)

<223> CDR3' = región hipervariable 3 de cadena ligera AIN457

55

<400> 6

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Cys Thr

1 5

5 <210> 7
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(381)
 <223> ADN del dominio de cadena pesada de AIN457

<400> 7

gag gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg
 48

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

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agt aac tat
 96

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

tgg atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aaa ggg ctg gag tgg gtg
 144

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

gcc gcc ata aac caa gat gga agt gag aaa tac tat gtg ggc tct gtg
 192

15 Ala Ala Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Gly Ser Val
 50 55 60

ES 2 487 533 T3

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg tat
240

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gtc gag gac acg gct gtg tat tac tgt
288

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

gtg agg gac tat tac gat att ttg acc gat tat tac atc cac tat tgg
336

Val Arg Asp Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Ile His Tyr Trp
100 105 110

tac ttc gat ctc tgg ggc cgt ggc acc ctg gtc act gtc tcc tca
381

Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210>8

<211> 127

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>8

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

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

10

ES 2 487 533 T3

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Val Arg Asp Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Ile His Tyr Trp
 100 105 110

Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 9
 <211> 327
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(327)
 <223> ADN de la parte variable de cadena ligera de AIN457

<400> 9

ES 2 487 533 T3

gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg

48

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc

96

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20

25

30

tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc

144

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35

40

45

atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt

192

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50

55

60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag

240

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65

70

75

80

cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca ccg

288

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85

90

95

tgc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa cga

327

Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg

100

105

- 5 <210> 10
- <211> 109
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- 10 <400> 10

<213> artificial

<220>

<223> CDR2-x de AIN457

5

<220>

<221> dominio

<222> (1) .. (11)

<223> CDR2-X = dominio hipervariable de cadena pesada X de AIN457

10

<400> 12

Ala Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr

1

5

10

15

<210> 13

<211> 23

<212> PRT

<213> artificial

20

<220>

<223> CDR3-x de AIN457

<220>

<221> dominio

<222> (1)..(23)

<223> CDR3-x = dominio hipervariable x de cadena pesada de AIN457

25

<400> 13

Cys Val Arg Asp Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Ile His Tyr

1

5

10

15

Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly

30

20

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

35

<213> artificial

<220>

<223> Cebador para clonación de la cadena pesada de AIN457

40

<220>

<221> enlazamiento del cebador

<222> (1)..(20)

<223> MV432

45

<400> 14

gactattacg atattttgac

20

50

<210> 15

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador para clonación de la cadena pesada de AIN457

<220>

<221> enlazamiento del cebador

5 <222> (1) .. (20)

<223> MV433

<400> 15

gcctccacca agggcccatc

10

20

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

15 <213> artificial

<220>

<223> cebador para clonación de la cadena pesada de AIN457

20 <220>

<221> enlazamiento del cebador

<222> (1) .. (20)

<223> MV434

25 <400> 16

tggttcccgg gtagccagaa

20

<210> 17

30 <211> 20

<212> ADN

<213> artificial

<220>

35 <223> cebador para clonación de la cadena pesada de AIN457

<220>

<221> enlazamiento del cebador

<222>(1) .. (20)

40 <223> MV435

<400> 17

ccacctgttc tctcaactcg

20

45

<210> 18

<211> 24

<212> ADN

<213> artificial

50

<220>

<223> PCR de la cadena pesada de AIN457

<220>

55 <221> enlazamiento del cebador

<222>(1) .. (24)

<223> MV416

<400> 18

60

accatggaat tggggctgag ctgg

24

5 <210> 19
<211> 26
<212> ADN
<213> artificial

10 <220>
<223> PCR de la cadena pesada de AIN457

<220>
<221> enlazamiento del cebador
<222> (1) .. (26)
<223> #265

15 <400> 19

gagtgtgtac gggtagcacg ggtatt

26

20 <210> 20
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial

25 <220>
<223> PCR de la cadena pesada de AIN457

30 <220>
<221> enlazamiento del cebador
<222> (1) .. (21)
<223> MV418

<400> 20

gaggtgcagt tggtagagtc t

35 **21**

<210> 21
<211> 24
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> PCR de la cadena ligera de AIN457

45 <220>
<221> enlazamiento el cebador
<222> (1) .. (24)
<223> MV417

50 <400> 21

accatggaaa ccccagcgga gctt

24

55 <210> 22
<211> 22
<212> ADN

<213> artificial

ES 2 487 533 T3

<220>
<223> PCR de la cadena ligera de AIN457

5 <220>
<221> enlazamiento del cebador
<222> (1) .. (22)
<223> #223

10 <400> 22

gaagttgtcc cctctcacia tc
22

15 <210> 23
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial

20 <220>
<223> PCR de la cadena ligera de AIN457

<220>
<221> enlazamiento del cebador
<222> (1) .. (21)
<223> MV419

25 <400> 23

gaaattgtgt tgacgcagtc t
21

30

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que se enlaza con IL-17 o un fragmento del mismo que comprende tanto los dominios variables de cadena ligera (V_L) como los de cadena pesada (V_H); donde dicho anticuerpo que se enlaza con IL-17 o un fragmento del mismo comprende por lo menos un sitio de enlazamiento con el antígeno que comprende:
- 5 a) un V_H que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, teniendo dicha CDR1 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, teniendo dicha CDR2 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y teniendo dicha CDR3 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, en donde dichas regiones hipervariables están de acuerdo con la definición de Kabat; o
- 10 un V_H que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1-x, CDR2-x y CDR3-x, teniendo dicha CDR1-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, teniendo dicha CDR2-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 y teniendo dicha CDR3-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, en donde dichas regiones hipervariables están de acuerdo con la definición de Chothia; y
- 15 b) un V_L que comprende en secuencia las regiones hipervariables CDR1', CDR2' y CDR3', teniendo dicha CDR1' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, teniendo dicha CDR2' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y teniendo dicha CDR3' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.
2. El anticuerpo que se enlaza con IL-17 o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 que es un anticuerpo humano.
- 20 3. Un anticuerpo que se enlaza con IL-17 o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende por lo menos un sitio de enlazamiento con el antígeno que comprende ya sea:
- 25 a) un V_H que tiene una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 8;
- b) un V_L que tiene una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 10; o
- 30 c) un V_H que tiene una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 8 y un V_L que tiene una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID NO: 10.
4. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo que se enlaza con IL-17 o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en combinación con un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende un segundo ingrediente activo.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el segundo ingrediente activo se selecciona del grupo que consiste de agentes inmunosupresores, agentes inmunomoduladores, agentes antiinflamatorios, agentes quimioterapéuticos y agentes antiinfecciosos.
- 40 7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el segundo ingrediente activo es un agente inmunomodulador seleccionado del grupo que consiste de sales de oro, sulfasalazina, agentes contra la malaria, metotrexato, D-penicilamina, azatioprina, ácido micofenólico, ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus, minociclina, leflunomida, glucocorticoides; un inhibidor de calcineurina; un modulador de recirculación de linfocitos, por ejemplo FTY720 y análogos de FTY720; un inhibidor de mTOR, por ejemplo rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, CCI779, ABT578, AP23573 o Tafa-93; una ascomicina que tiene propiedades inmunosupresoras, por ejemplo ABT-281, ASM981, etc.; corticosteroides; ciclofosfamida; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico; mofetil micofenolato; 15-desoxiespergualina.
- 45 8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el agente inmunomodulador es metotrexato.
- 50 9. Un kit, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de:
- 55 a) un anticuerpo que se enlaza con IL-17 o un fragmento del mismo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4,
- b) al menos una segunda sustancia seleccionada del grupo que consiste de agentes inmunosupresores, agentes inmunomoduladores, agentes antiinflamatorios, agentes quimioterapéuticos o agentes antiinfecciosos; y
- 60 c) opcionalmente, instrucciones para administración.
10. El anticuerpo que se enlaza con IL-17 o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 para uso en el tratamiento de soriasis.
- 65 11. El anticuerpo que se enlaza con IL-17 o un fragmento del mismo de la reivindicación 10, en donde dicho anticuerpo que se enlaza con IL-17 o un fragmento del mismo se administra conjuntamente, en forma concomitante

o en secuencia, con al menos una segunda sustancia farmacéutica seleccionada del grupo que consiste de agentes inmunosupresores, agentes inmunomoduladores, agentes antiinflamatorios, agentes quimioterapéuticos o agentes antiinfecciosos.

- 5 12. El anticuerpo que se enlaza con IL-17 o un fragmento del mismo de la reivindicación 11, en donde dicho anticuerpo que se enlaza con IL-17 o un fragmento del mismo se administra conjuntamente, en forma concomitante o en secuencia, con sales de oro, sulfasalazina, agentes contra la malaria, metotrexato, D-penicilamina, azatioprina, ácido micofenólico, ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus, minociclina, leflunomida, glucocorticoides; un inhibidor de calcineurina; un modulador de recirculación de linfocitos, por ejemplo FTY720 y análogos de FTY720; un inhibidor de mTOR, por ejemplo rapamicina, 40-O-(2-hidroxietil)-rapamicina, CCI779, ABT578, AP23573 o Tafa-93; una ascomicina que tiene propiedades inmunosupresoras, por ejemplo ABT-281, ASM981, etc.; corticosteroides; ciclofosfamida; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico; mofetil micofenolato; 15- desoxiespergualina.
- 10
13. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 4 - 8, el kit de la reivindicación 9, para uso en el tratamiento de soriasis.
- 15
14. Un constructo de ADN que codifica el anticuerpo que se enlaza con IL-17 o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3.
- 20
15. El constructo de ADN de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende un primer polinucleótido que comprende la SEQ ID NO: 7 y un segundo polinucleótido que comprende la SEQ ID NO: 9.
- 25
16. Un vector de expresión capaz de replicar en una línea celular eucariota que comprende por lo menos un constructo de ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 - 15.

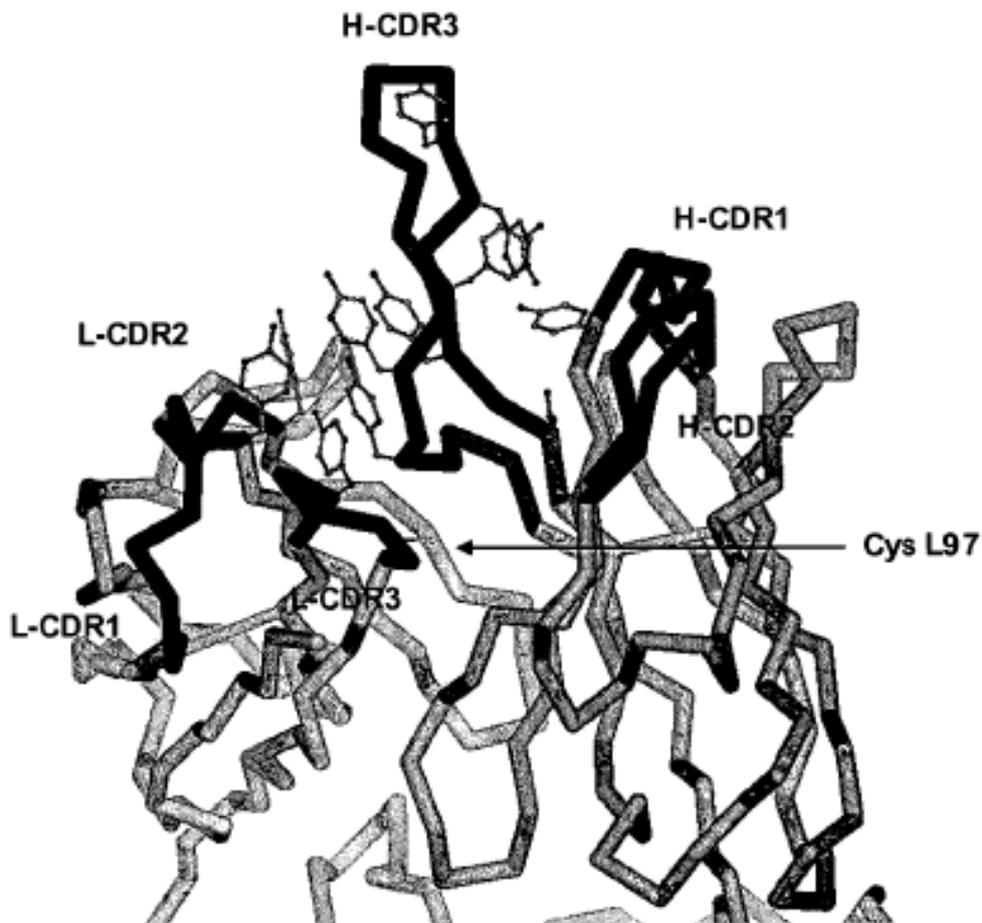


Figura 1. Estructura de rayos X de Fab de AIN457

5 Vista de un acercamiento de los dominios variables del Fab de AIN457 (traza C) con
 las regiones de determinación de complementariedad resaltadas. Se muestran todas
 las cadenas laterales de tirosina contribuidas por los bucles de CDR, para ilustrar el
 hecho de que el sitio de combinación del antígeno de AIN457 es excepcionalmente rico
 10 en residuos de tirosina. También se muestra (flecha) la cadena lateral de Cys L97, en
 la interfaz $V_L - V_H$.

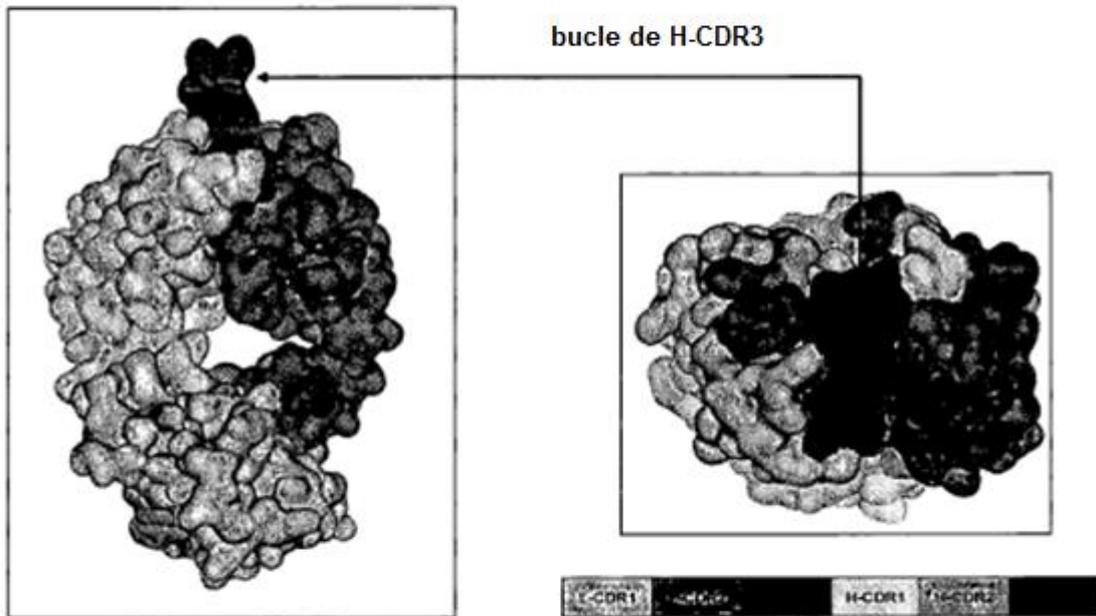


Figura 2. Estructura de rayos X del Fab de AIN457, vista general

5 Representación de la superficie de Van der Waals del Fab de AIN457. Las cadenas ligera y pesada están coloreadas de color gris claro y oscuro, respectivamente. Los bucles de CDR se resaltan en diferentes colores. Obsérvese la presencia del bucle de H-CDR3 que sobresale del sitio de combinación del antígeno del anticuerpo.