

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2006.12.05</b>	(73) Titular(es): <b>ELI LILLY AND COMPANY</b> <b>LILLY CORPORATE CENTER INDIANAPOLIS, IN</b> <b>46285</b> <b>US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2005.12.13 US 749953 P</b> <b>2006.05.19 US 801948 P</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2008.09.03</b>	(72) Inventor(es): <b>KINGMAN NG</b> <b>US</b> <b>LIHUA HUANG</b> <b>US</b> <b>BARRETT ALLAN</b> <b>US</b> <b>CHI-KIN CHOW</b> <b>US</b> <b>JIRONG LU</b> <b>US</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2012.07.18</b> <b>178/2012</b>	(74) Mandatário: <b>ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS</b> <b>RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI-IL-17**

(57) Resumo:

SÃO IDENTIFICADOS ANTICORPOS ANTI-IL-17 QUE SÃO CARACTERIZADOS POR POSSUÍREM UMA AFINIDADE ELEVADA E UMA TAXA DE ELIMINAÇÃO BAIXA PARA A IL-17 HUMANA. OS ANTICORPOS DA INVENÇÃO PODEM SER QUIMÉRICOS, HUMANIZADOS OU ANTICORPOS TOTALMENTE HUMANOS, IMUNOCONJUGADOS DOS ANTICORPOS OU SEUS FRAGMENTOS DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO. OS ANTICORPOS DA INVENÇÃO SÃO ÚTEIS, EM PARTICULAR, PARA TRATAR DISTÚRBIOS AUTOIMUNES, INFLAMATÓRIOS, DE PROLIFERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO CELULAR.

**RESUMO**

**"ANTICORPOS ANTI-IL-17"**

São identificados anticorpos anti-IL-17 que são caracterizados por possuírem uma afinidade elevada e uma taxa de eliminação baixa para a IL-17 humana. Os anticorpos da invenção podem ser quiméricos, humanizados ou anticorpos totalmente humanos, imunoconjugados dos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio. Os anticorpos da invenção são úteis, em particular, para tratar distúrbios autoimunes, inflamatórios, de proliferação e desenvolvimento celular.

**DESCRIÇÃO****"ANTICORPOS ANTI-IL-17"****CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção situa-se no campo da medicina, particularmente no campo dos anticorpos monoclonais contra IL-17 humana. A invenção refere-se a anticorpos monoclonais anti-IL-17 neutralizantes que se ligam com elevada afinidade a um epitopo antigénico não linear ou conformacional de IL-17, que compreende os aminoácidos DGNVDYH (SEQ ID NO: 276). Os anticorpos da invenção podem ser quiméricos, humanizados ou anticorpos humanos, imunocjugados dos anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio e são úteis como um medicamento para o tratamento de distúrbios auto-imunes, inflamatórios, de proliferação e desenvolvimento celular.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

A família IL-17 das citocinas inclui actualmente IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. Todos os membros da família IL-17 possuem quatro resíduos de cisteína altamente conservados que estão envolvidos na formação de ligações persulfureto intracadeia e possuem dois ou mais resíduos de cisteína que podem estar envol-

vidos nas ligações persulfureto intercadeia. Os membros da família IL-17 não possuem semelhança de sequências com nenhuma das outras citocinas conhecidas. Contudo, observou-se um homólogo viral da IL-17 na grelha de leitura aberta 13 do vírus herpes saimiri (Yao, Z, *et. al*, *Immunity*, 3:811, 1995) e possui uma identidade de 72% em resíduos de aminoácidos com a IL-17A humana. Foram relatadas múltiplas funções para os membros da família IL-17 que envolvem principalmente a regulação da resposta imunitária.

A interleucina 17 (IL-17, também referida como IL-17A) é uma glicoproteína homodimérica de 20-30 kD produzida predominantemente através de células T CD4+ activadas e funciona como uma citocina pró-inflamatória. Quando um membro em particular da família IL-17 é referido simplesmente como "IL-17", entende-se que o referido membro da família é o IL-17A. A IL-17 é secretada por células T activadas nos sítios da inflamação que não estão na circulação sistémica. A IL-17 liga-se a um receptor de transmembrana de tipo I denominado IL-17R que é uma proteína grande que se expressa de forma ubíqua, que não apresenta uma semelhança de sequência significativa com nenhuns outros receptores de citocina conhecidos. A IL-17 possui múltiplas propriedades biológicas, incluindo moléculas de adesão de regulação positiva e a indução da produção de múltiplas citocinas inflamatórias e quimiocinas de vários tipos de células, incluindo sinoviócitos, condrócitos, fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais, queratinócitos, e macrófagos. A IL-17 também

induz o recrutamento de neutrófilos para um local inflamatório através da indução da libertação de quimiocinas, estimula a produção de prostaglandinas e de metaloproteinases e inibe a síntese de proteoglicano. Para além disso, a IL-17 desempenha um papel importante na maturação das células progenitoras hematopoiéticas. Foi demonstrado que a IL-17 possui papéis de sinalização em diferentes órgãos e tecidos, incluindo o pulmão, cartilagem articular, osso, cérebro, células hematopoiéticas, rim, pele e intestino. Para uma revisão da bioactividade da IL-17, ver, e.g., Kolls e Linden, *Immunity* 21:467-476, 2004, ou Fossiez, et al. *Int. Rev. Immunol.* 16:541, 1998.

Os níveis aumentados de IL-17 (*i.e.*, IL-17A) têm sido associados a vários estados, doenças ou distúrbios, incluindo inflamação das vias respiratórias, artrite reumatóide ("RA"), osteoartrite, erosão óssea, abscessos e adesões intraperitoneais, distúrbio do intestino inflamatório ("IBD"), rejeição de aloenxertos, psoríase, certos tipos de cancro, angiogénese, aterosclerose e esclerose múltipla ("MS") (para uma revisão ver Witkowski, et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 61:567-579, 2004). Ambas IL-17 e IL-17R são reguladas positivamente no tecido sinovial dos doentes com RA. O bloqueamento de uma bioactividade de IL-17 através da ligação de um anticorpo específico para IL-17 ou receptor solúvel para IL-17 reduz a inflamação e a erosão óssea em vários modelos de artrite animal. (Ver, e.g., Lubberts et al., *Arthritis & Rheumatism*, 50:650-659, 2004). Para além disso, a IL-17 possui efeitos

independentes de IL-1 $\beta$  a degradação e inflamação da matriz de colagénio e na lesão das articulações, enquanto a IL-17 tem sinergia com TNF- $\alpha$  para amplificar a inflamação.

Assim, dada a sua distribuição localizada no sítio da inflamação, a IL-17 parece ser um novo alvo para o tratamento de RA e de outras doenças inflamatórias ou auto-imunes com um perfil de segurança potencialmente superior do que o dos fármacos que têm como alvo a circulação sistémica de citocinas pró-inflamatórias, tais como a TNF- $\alpha$ . Os bioprodutos actualmente aprovados pela FDA (os anticorpos ENBREL<sup>®</sup>, REMICADE<sup>®</sup> e HUMIRA<sup>®</sup>) que se ligam a, e neutralizam a TNF- $\alpha$  demonstraram eficácia na redução de sinais e sintomas de RA e no retardamento da progressão da doença num subconjunto de doentes com RA. Contudo, nem todos os doentes com RA respondem de forma igual à inibição de uma bioactividade de TNF- $\alpha$  com estes bioprodutos.

Adicionalmente, o mRNA de IL-17 é aumentado nas lesões de esclerose múltipla e nas células mononucleares no sangue e no fluido cefalorraquidiano em doentes com MS, particularmente durante a exacerbação clínica. Consequentemente, existe uma necessidade para composições que antagonizem ou neutralizem a actividade de IL-17 de modo a tratar distúrbios, doenças ou estados em que a presença da bioactividade de IL-17 provoca ou contribui para um efeito patológico indesejável ou em que uma diminuição na bioactividade da IL-17 contribui para um efeito terapêutico desejável, incluindo distúrbios inflamatórios, distúrbios

de proliferação e desenvolvimento celular e distúrbios auto-imunes, tais como RA e MS e IBD.

Giavedoni, L D, *Journal of Immunological Methods*, Vol. 301, N° 1-2, 89-101, Junho de 2005, descreve a detecção simultânea de múltiplas citocinas e quimiocinas a partir de primatas não humanos utilizando a tecnologia luminex. São mencionados três anticorpos anti-IL-17 na Tabela 1.

Moseley, T A, et al., *Cytokine and Growth Factor Reviews*, Vol. 14, N° 2, 155-174, Abril de 2003, descreve a famílias das interleucinas-17 e os receptores de IL-17.

WO 2004/106377 descreve um método para obter um anticorpo com uma função desejada. Os anticorpos anti-IL-17 C9 e D12 são descritos na Tabela 4.

Hofstetter et al., *Cellular Immunology*, Vol. 237, N° 2 123-130, Outubro 2005, descreve a eficiência terapêutica da neutralização de IL-17 em encefalomielite auto-imune experimental. Foi observado que a neutralização de IL-17 com um anticorpo monoclonal melhora o curso da doença.

Há uma necessidade para um anticorpo neutralizante anti-IL-17 que se liga especificamente a IL-17 de origem humana assim como IL-17 de um mamífero não humano permitindo desse modo que o anticorpo seja utilizado em

estudos pré-clínicos e clínicos *in vivo*. Para além disso, existe uma necessidade para um anticorpo específico para IL-17 que se ligue a IL- 17 com uma afinidade elevada e/ou possua uma taxa de eliminação lenta permitindo desse modo que uma dose terapêutica eficaz seja minimizada resultando numa dosagem menos frequente com um tal anticorpo do que com um anticorpo que se liga a IL- 17 com uma afinidade menor (*i.e.*, um  $K_D$  superior) e/ou possua uma taxa de eliminação mais rápida. É também desejável um anticorpo específico para IL-17 com afinidade elevada na medida em que pode permitir que o anticorpo seja administrado a um doente subcutaneamente em vez de intravenosamente. Há também uma necessidade para um anticorpo específico para IL-17 com um valor de  $IC_{50}$  baixo num ensaio de bioactividade de IL- 17 de modo a criar um anticorpo anti-IL-17 terapêutico com uma dose mínima de efeito terapêutico. É também desejável proporcionar um anticorpo específico para IL- 17 em que uma resposta imunitária para o anticorpo produzida por um doente que recebe o anticorpo é reduzida para um mínimo. A presente invenção satisfaz estas necessidades e proporciona vantagens relacionadas.

#### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

O âmbito da presente invenção é definido pelas reivindicações e qualquer informação que não caiam dentro das reivindicações é fornecida apenas para informação.

Os anticorpos da invenção são anticorpos monoclo-

nais anti-IL-17 quiméricos, humanizados, ou totalmente humanos, e suas porções de ligação ao antigénio, que se ligam a um epitopo não linear que compreende os aminoácidos de IL-17 DGNVDYH (SEQ ID NO: 276) e antagonizam ou neutralizam pelo menos uma actividade biológica *in vitro* ou *in vivo* associada a IL-17 ou a uma porção desta.

Numa forma de realização, os anticorpos da invenção possuem uma IC<sub>50</sub> inferior a, ou igual a cerca de 1 nM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 600 pM, 560 pM ou 500 pM num ensaio de repórter de IL-8 *in vitro*, como descrito, por exemplo, no Exemplo 6A aqui referido ou inferior a ou igual a 560 pM num Ensaio de Repórter de GRO $\alpha$  *in vitro* como descrito, por exemplo, no Exemplo 6B aqui referido.

Noutra forma de realização, os anticorpos da invenção são caracterizados por uma forte afinidade de ligação (K<sub>D</sub>) para IL-17 humana, *i.e.*, inferior a cerca de 7 pM, 6,5 pM, 6,0 pM, 5,5 pM, 5,0 pM, 4,5 pM ou 4,0 pM. Alternativamente, os anticorpos da invenção são caracterizados por uma K<sub>D</sub> para IL-17 humana não superior a cerca de 7 pM, 6,5 pM, 6,0 pM, 5,5 pM, 5,0 pM, 4,5 pM ou preferencialmente não superior a cerca de 4,0 pM. Preferencialmente, os anticorpos da invenção são ainda caracterizados com uma taxa de k<sub>off</sub> de IL-17 humana inferior a  $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ .

Noutra forma de realização, um anticorpo anti-IL-17 da invenção é caracterizado ligando especificamente IL-

17 humana, assim como IL-17 de macaco cinomólogo embora não se ligando a IL-17 de murganho ou de rato a níveis superiores ao fundo. Adicionalmente, um anticorpo anti-IL-17 da invenção liga IL-17 humana (*i.e.*, IL-17A), mas não se liga a IL-17B, C, D, E ou F humanas.

Numa forma de realização, um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção compreende um polipéptido da região variável de cadeia leve ("LCVR") compreendendo 3 sequências de CDR que estão presentes em conjunto num Fab listado na Tabela 3, aqui referida abaixo e que estão presentes no anticorpo da invenção na mesma posição de CDR como no Fab listado na Tabela 3. Preferencialmente, um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção compreende um polipéptido de LCVR com uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 178-243.

Noutra forma de realização, um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção compreende uma região variável de cadeia pesada ("HCVR") compreendendo o polipéptido 3 CDRs que estão presentes em conjunto numa Fab listada na Tabela 2 aqui referido abaixo e que estão presentes no anticorpo da invenção na mesma posição da CDR como na Fab listada na Tabela 2. Preferencialmente, um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção compreende um polipéptido de HCVR com uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 56-121.

Noutra forma de realização, um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção compreende um polipéptido de LCVR compreendendo 3 CDRs que estão presentes em conjunto numa Fab listada na Tabela 3 e que estão presentes no anticorpo da invenção na mesma posição de CDR que na Fab listada na Tabela 3 e compreende ainda um polipéptido de HCVR compreendendo 3 CDRs que estão presentes em conjunto numa Fab listada na Tabela 2 e que estão presentes no anticorpo da invenção na mesma posição de CDR que na Fab listada na Tabela 2. Preferencialmente, as 6 CDRs de um anticorpo da invenção, ou seu fragmento funcional, existem em conjunto numa Fab listada na Tabela 1 aqui referida abaixo e estão presentes no anticorpo da invenção na mesma posição de CDR que na Fab listada na Tabela 1.

Numa forma de realização preferida, um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção compreende (i) um polipéptido de LCVR com uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 178-243 e (ii) um polipéptido de HCVR com uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 56-121. Numa forma de realização mais preferida, um anticorpo da invenção compreendendo um polipéptido de LCVR com uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 178-243 compreende ainda o polipéptido de HCVR seleccionado a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 56-121 que está presente numa Fab listada na Tabela 1 que compreende o LCVR particular presente no anticorpo.

Noutra forma de realização, um anticorpo monoclonal da invenção é aquele que pode competir pela ligação a IL-17 humana, ou uma porção de IL-17 humana, com um anticorpo de competição em que o anticorpo de competição compreende dois polipéptidos com as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 241 e 118.

Noutra forma de realização, uma LCVR de um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção compreende 1, 2 ou 3 péptidos, preferencialmente 3 péptidos, seleccionados a partir do grupo que consiste nos péptidos com uma sequência como apresentado em (a) SEQ ID NOs: 122-149; (b) SEQ ID NOs: 150-167, e (c) SEQ ID NOs:168-177 (*i.e.*, um péptido de (a), um péptido de (b) e um péptido de (c) para um anticorpo compreendendo os referidos 3 péptidos). Um péptido com a sequência apresentada nas SEQ ID NOs: 122-149, quando presente num anticorpo da invenção, está na CDRL1. Um péptido com a sequência apresentada nas SEQ ID NOs: 150-167, quando presentes num anticorpo da invenção, está na CDRL2. Um péptido com a sequência apresentada nas SEQ ID NOs: 150-167, quando presentes num anticorpo da invenção, está na CDRL3.

Noutra forma de realização, uma HCVR de um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção compreende 1, 2 ou 3 péptidos, preferencialmente 3 péptidos, seleccionados a partir do grupo que consiste nos péptidos com uma sequência como apresentado em (a) SEQ ID NOs: 11-28; (b)

SEQ ID NOs: 29-32, e (c) SEQ ID NOs: 33-55 e 261 (*i.e.*, um péptido de (a), um péptido de (b) e um péptido de (c) para um anticorpo compreendendo os 3 péptidos referidos). Um péptido com a sequência apresentada nas SEQ ID NOs: 11-28, quando presente no referido anticorpo, está em CDRH1. Um péptido com a sequência apresentada nas SEQ ID NOs: 29-32, quando presente no referido anticorpo, está na CDRH2. Um péptido com a sequência apresentada nas SEQ ID NOs: 33-55 e 261, quando presente no referido anticorpo, está na CDRH3.

A presente invenção proporciona ainda um anticorpo monoclonal anti-IL-17 compreendendo seis péptidos seleccionados a partir do grupo que consiste nos péptidos com uma sequência como apresentada em (a) SEQ ID NOs: 122-149; (b) SEQ ID NOs: 150-167, (c) SEQ ID NOs: 168-177, (d) SEQ ID NOs: 11-28; (e) SEQ ID NOs: 29-32, e (f) SEQ ID NOs: 33-55 e 261 (*i.e.*, um péptido de cada um de (a-f)); preferencialmente os seis péptidos coexistem num Fab listado aqui na Tabela 1. Um péptido com a sequência apresentada nas SEQ ID NOs: 122-149, quando presentes num anticorpo da invenção, está na CDRL1. Um péptido com a sequência apresentada nas SEQ ID NOs: 150-167, quando presente num anticorpo da invenção, está na CDRL2. Um péptido com a sequência apresentada nas SEQ ID NOs: 150-167, quando presente num anticorpo da invenção, está na CDRL3. Um péptido com a sequência apresentada nas SEQ ID NOs: 11-28, quando presente no referido anticorpo, está na CDRH1. Um péptido com a sequência apresentada nas SEQ ID NOs: 29-32, quando presente no referido anticorpo, está na

CDRH2. Um péptido com a sequência apresentada nas SEQ ID NOs: 33-55 e 261, quando presente no referido anticorpo, está na CDRH3.

A presente invenção proporciona ainda um anticorpo monoclonal anti-IL-17 compreendendo os seis péptidos com as sequências como apresentadas nas SEQ ID NOs: 247, 248, 249, 244, 245 e 246. O péptido com a sequência apresentada na SEQ ID NO: 247 está na CDRL1. O péptido com a sequência apresentada na SEQ ID NO: 248 está na CDRL2. O péptido com a sequência apresentada na SEQ ID NO: 249 está na CDRL3. O péptido com a sequência apresentada na SEQ ID NO: 244 está na CDRH1. O péptido com a sequência apresentada na SEQ ID NO: 245 está na CDRH2. O péptido com a sequência apresentada na SEQ ID NO: 246 está na CDRH3.

Um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção pode compreender ou consistir num anticorpo intacto (*i.e.*, comprimento total), um anticorpo substancialmente intacto ou uma sua porção de ligação ao antigénio, *e.g.*, um fragmento Fab, um fragmento F(ab')<sub>2</sub> ou um fragmento Fv de cadeia simples. Para além disso, um anticorpo da invenção pode ser marcado com um marcador detectável, imobilizado numa fase sólida e/ou conjugado com um composto heterólogo, *e.g.*, uma enzima, toxina ou molécula de polietilenoglicol.

Noutra forma de realização, a invenção proporciona um método de preparação de um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção compreendendo manter uma célula

hospedeira da invenção (*i.e.*, a célula hospedeira que foi transformada, transduzida ou infectada com um vector (ou vectores) da invenção que expressa um anticorpo da invenção) nas condições apropriadas para expressão de um anticorpo monoclonal da invenção, através do qual esse anticorpo é expresso. O método pode ainda compreender o passo de isolar o anticorpo monoclonal da invenção a partir da célula ou preferencialmente a partir do meio de cultura no qual a célula é cultivada.

Estão contempladas utilizações para diagnóstico para os anticorpos monoclonais da invenção. Numa aplicação de diagnóstico, a invenção proporciona um método para determinar o nível de proteína IL-17 numa amostra compreendendo expor uma amostra a ser testada a um anticorpo anti-IL-17 da invenção em condições de ligação e determinar a ligação específica do anticorpo à amostra. Um anticorpo anti-IL-17 da invenção pode ser utilizado para determinar os níveis de IL-17 em amostras de teste através da comparação dos valores da amostra de teste com uma curva padrão criada através da ligação do referido anticorpo às amostras com quantidades conhecidas de IL-17. A invenção proporciona ainda um estojo ("kit") compreendendo um anticorpo da invenção e, preferencialmente, instruções para utilizar o anticorpo para detectar a proteína IL-17 numa amostra.

A invenção proporciona uma composição, preferencialmente uma composição farmacêutica, compreendendo um

anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção. A composição farmacêutica da invenção pode ainda compreender um veículo, excipiente e/ou diluente farmacêuticamente aceitáveis. Na referida composição farmacêutica, o anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção é o único ingrediente activo. Preferencialmente, a composição farmacêutica compreende uma população homogénea ou substancialmente homogénea de um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção. A composição para utilização terapêutica é fisiologicamente compatível, estéril e pode ser liofilizada e opcionalmente fornecida com um diluente apropriado.

É aqui revelado um método de inibição de pelo menos uma bioactividade de IL-17 num animal, preferencialmente um mamífero, mais preferencialmente um humano, que dele tem necessidade, compreendendo administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz, ou quantidade neutralizadora de IL-17, de um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção ao referido animal. É aqui também revelado um método de tratamento de uma doença ou distúrbio melhorado pela neutralização ou antagonizar de uma bioactividade de IL-17, *e.g.*, inibição de transdução de sinal que resulta da ligação de IL-17 ao seu receptor, que compreende administrar a um doente (*e.g.*, um humano) em necessidade desse tratamento ou prevenção de uma quantidade terapêuticamente eficaz de quantidade neutralizadora de IL-17, de um anticorpo monoclonal da invenção.

A invenção corporiza um anticorpo monoclonal

anti-IL-17 da invenção para utilização no fabrico de um medicamento para administração a um mamífero, preferencialmente um humano, para o tratamento de, e.g., um distúrbio auto-imune ou distúrbio de inflamação ou distúrbio de proliferação celular.

A invenção incorpora ainda um artigo de fabrico compreendendo um material de empacotamento e um anticorpo da invenção contido no referido material de empacotamento, em que o material de empacotamento compreende uma inserção na embalagem que indica que o anticorpo neutraliza especificamente uma actividade de IL-17 ou diminui o nível de IL-17 funcional presente no sistema.

A invenção proporciona ainda moléculas de ácido nucleico isolado que codificam um anticorpo da invenção ou sua cadeia leve ou cadeia pesada; um vector (ou vectores) compreendendo o referido ácido nucleico, ligado opcionalmente de uma forma operacional a sequências de controlo reconhecidas por uma célula hospedeira transformada com o vector; uma célula hospedeira compreendendo esse vector; um processo para produzir um anticorpo da invenção compreendendo cultivar a célula hospedeira de modo a que o ácido nucleico seja expresso e, opcionalmente, recuperar o anticorpo a partir do meio de cultura da célula hospedeira.

A invenção proporciona ainda moléculas de ácido nucleico isolado que codificam IL-17 de macaco cinomólogo (SEQ ID NO: 253) ou IL-17 de coelho (SEQ ID NO: 251); a

proteína IL-17 codificada pelo ácido nucleico de macaco ou coelho (SEQ ID NOs: 10 ou 9 respectivamente); compreendendo os vectores a referida molécula de ácido nucleico; a célula hospedeira compreendendo o referido vector; e um processo para produzir IL-17 de macaco cinomólogo ou IL-17 de coelho.

### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A FIG. 1 apresenta o alinhamento das sequências de aminoácidos de membros da família das proteínas de IL-17 humanas (IL-17, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F).

A FIG. 2 apresenta o alinhamento das sequências de aminoácidos de DL-17 das espécies humana, coelho, rato, macaco cinomólogo e murino.

### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

O âmbito da presente invenção é definido pelas reivindicações e qualquer informação que não caia nas reivindicações é fornecida apenas para informação.

A invenção apresenta anticorpos monoclonais anti-IL-17 quiméricos, humanizados ou totalmente humanos, ou suas porções de ligação ao antígeno, capazes de neutralizar ou antagonizar pelo menos uma actividade de IL-17 *in vitro* e/ou *in vivo*. Preferencialmente, esses anticorpos da invenção são ainda caracterizados como

possuindo uma  $IC_{50}$  inferior a cerca de 600 ou 560 pM em e.g., um ensaio de repórter de IL-8 *in vitro* ou ensaio repórter de GRO $\alpha$  (ver, e.g., Exemplo 6) e/ou preferencialmente possuindo uma forte afinidade de ligação com IL-17 inferior a 4 pM. Os anticorpos da invenção são ainda caracterizados por se ligarem especificamente a IL-17 de humano e de macaco cinomólogo (SEQ ID NOs: 1 e 10 respectivamente) mas não se ligarem a IL-17 de murino ou de rato (SEQ ID NOs: 7 e 8 respectivamente). O epitopo antigénico ao qual os anticorpos monoclonais da invenção se liga é um epitopo não linear de IL-17 de humano (e macaco) e compreende os resíduos DGNVDYH (SEQ ID NO: 276) de IL-17. Um anticorpo da invenção toma contacto com o péptido DGNVDYH quando está no contexto da IL-17 de comprimento total.

#### Definições

"Interleucina 17" também referida como "IL-17" ou "IL-17A" é uma proteína de 20-30 kD glicosilada homodimérica. O gene de IL-17 humano codifica para uma proteína de 155 aminoácidos que possui uma sequência sinal de 19 aminoácidos e um segmento maduro de 136 aminoácidos. A IL-17 humana apresenta uma identidade de sequência de aminoácidos de 62,5% e 58% em relação às sequências de aminoácidos de IL-17 de murganho e de rato, respectivamente como apresentado na Figura 2. A IL-17 humana apresenta uma identidade de sequência de aminoácidos de 97,4% em relação a IL-17 de macaco cinomólogo.

Um anticorpo de comprimento total, como existe naturalmente, é uma molécula de imunoglobulina compreendida por quatro cadeias peptídicas, duas cadeias pesadas (H) (cerca de 50-70 kDa quando de comprimento total) e duas cadeias leves (L) (cerca de 25 kDa quando de comprimento total) interligadas através de ligações persulfureto. A porção amino terminal de cada cadeia inclui uma região variável de cerca e 100-110 ou mais aminoácidos principalmente responsáveis pelo reconhecimento do antigénio. A porção carboxi-terminal de cada cadeia define uma região constante principalmente responsável pela função efectora.

As cadeias leves são classificadas como kapa ou lambda e caracterizadas por uma região constante particular. Cada cadeia leve é compreendida por uma região variável de cadeia leve N-terminal (aqui referida como "LCVR") e uma região constante da cadeia leve compreendida por um domínio, CL. As cadeias pesadas são classificadas como gama, mu, alfa, delta, ou epsilon, e define o isotipo do anticorpo como IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, respectivamente e vários destes podem ser ainda divididos em sub-classes (isotipos) e.g., IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Cada tipo de cadeia pesada é caracterizado por uma região constante particular. Cada cadeia pesada é compreendida por uma região variável de cadeia pesada N-terminal (aqui referida como "HCVR") e uma região constante de cadeia pesada. A região constante de cadeia pesada é compreendida por três domínios (CH1, CH2, e CH3) para IgG, IgD, e IgA; e 4 domínios (CH1, CH2, CH3, e CH4) para IgM e IgE.

As regiões HCVR e LCVR podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões de determinação de complementaridade ("CDRs"), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões de grelha ("FR"). Cada HCVR e LCVR é composta de três CDRs e quatro FRs, dispostas do terminal amino para o terminal carboxilo na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Para os anticorpos de comprimento total da invenção as cadeias leves compreendem preferencialmente, a jusante de FR4, um polipéptido com a sequência apresentada na SEQ ID NO: 277. Para os anticorpos de comprimento total da invenção, as cadeias pesadas compreendem preferencialmente, a jusante de FR4, um polipéptido com a sequência apresentada na SEQ ID NO: 278. Aqui, as 3 CDRs da cadeia pesada são referidas como "CDRH1, CDRH2, e CDRH3" e as 3 CDRs da cadeia leve são referidas como "CDRL1, CDRL2 e CDRL3." As CDRs contêm a maioria dos resíduos que formam interações específicas com o antígeno. A numeração e o posicionamento dos resíduos de aminoácidos da CDR nas regiões HCVR e LCVR estão de acordo com a convenção de numeração de Kabat bem conhecida.

O termo "anticorpo," em referência a um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção (ou simplesmente "anticorpo da invenção"), como aqui utilizado, refere-se a um anticorpo monoclonal. Um "anticorpo monoclonal", como aqui utilizado refere-se a um anticorpo de roedor, preferencialmente de murino, um anticorpo quimérico, um anticorpo

humanizado ou um anticorpo totalmente humano, salvo aqui indicado em contrário. Podem ser produzidos anticorpos monoclonais da invenção utilizando e.g., técnicas de hibridoma bem conhecidas na técnica, assim como tecnologias recombinantes, tecnologias de apresentação em fago, tecnologias sintéticas ou recombinantes ou combinações de tecnologias já conhecidas na técnica. O termo "anticorpo monoclonal", como aqui utilizado, não está limitado aos anticorpos produzidos através da tecnologia dos hibridomas. "Anticorpo monoclonal" refere-se a um anticorpo que é derivado de uma cópia única ou de um clone, incluindo e.g., clone eucariótico, procariótico, ou de fago, e não o método através do qual é produzido. Um "anticorpo monoclonal" pode ser um anticorpo intacto (compreendendo uma região Fc completa ou de comprimento total), um anticorpo substancialmente intacto, ou uma porção ou fragmento de um anticorpo compreendendo uma porção de ligação ao antigénio, e.g., um fragmento Fab, fragmento Fab' ou fragmento F(ab')<sub>2</sub> de um anticorpo de murino ou de um anticorpo quimérico, humanizado ou humano. O fragmento "Fab" contém um domínio variável e constante da cadeia leve e um domínio variável e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. Os fragmentos do anticorpo "F(ab')<sub>2</sub>" compreendem um par de fragmentos Fab que são geralmente ligados covalentemente próximo dos seus terminais carboxilo através das cisteínas da dobra entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpo são também conhecidos na técnica.

A região variável de cada par de cadeia leve-

pesada forma um sítio de ligação ao antigénio do anticorpo. Assim, um anticorpo IgG intacto possui dois sítios de ligação. Excepto em anticorpos bifuncionais ou biespecíficos, os dois sítios de ligação ao antigénio do anticorpo são iguais. Como aqui utilizado, a "porção de ligação ao antigénio" ou "região de ligação ao antigénio" ou "domínio de ligação ao antigénio" refere-se indistintamente à porção de uma molécula de anticorpo que contém os resíduos de aminoácidos que interagem com um antigénio e conferem ao anticorpo a sua especificidade e afinidade para o antigénio. Esta porção de anticorpo inclui os resíduos de "grelha" dos aminoácidos necessários para manter a conformação apropriada dos resíduos de ligação ao antigénio. Preferencialmente, as CDRs da região de ligação ao antigénio dos anticorpos da invenção são inteiramente ou substancialmente de origem de murino, opcionalmente com certos resíduos de aminoácidos alterados, e.g., substituídos com um resíduo de aminoácido diferente, (ver e.g., as Tabelas 2 e 3) para otimizar uma propriedade particular do anticorpo, e.g.,  $K_D$ ,  $k_{off}$ ,  $IC_{50}$ . Preferencialmente, as regiões de grelha dos anticorpos da invenção são de origem humana ou substancialmente de origem humana (pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de origem humana. As regiões de grelha preferidas dos anticorpos da invenção possuem as seguintes sequências: SEQ ID NOS: 262 (HCVR FR1), 263 (HCVR FR2), 264 (HCVR FR3), 265 (HCVR FR4), 266 (LCVR FR1), 267 (LCVR FR2), 268 (LCVR FR3), 269 (LCVR FR4) e seguem a numeração de Kabat. Noutras formas de realização, a região de ligação ao antigénio de um anticorpo de

IL-17 da invenção pode ser derivada de outra espécie não humana incluindo, mas não limitada a, coelho, rato ou hamster. Alternativamente, a região de ligação ao antigénio pode ser derivada da sequência humana.

Para além disso, um "anticorpo monoclonal", como aqui utilizado, pode ser um fragmento Fv de cadeia simples que pode ser produzida através da união do DNA que codifica uma LCVR e o DNA que codifica uma HCVR com uma sequência de ligante. (Ver, Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg e Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp 269-315, 1994). É entendido que, independentemente de os fragmentos serem especificados, o termo "anticorpo", como aqui utilizado, inclui os fragmentos assim como as formas de cadeia simples. Desde que a proteína retenha a capacidade para se ligar especificamente ou preferencialmente ao seu alvo pretendido (*i.e.*, epitopo ou antigénio), está incluído no termo "anticorpo." Os anticorpos podem se ou não glicosilados e ainda assim caírem dentro das fronteiras da invenção.

Uma população de "anticorpos monoclonais," refere-se a uma população de anticorpos homogénea ou substancialmente homogénea (*i.e.*, pelo menos cerca de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, mais preferencialmente pelo menos cerca de 97% ou 98% ou muito preferencialmente pelo menos 99% dos anticorpos na população deve competir num ensaio de ELISA para o mesmo antigénio ou epitopo ou mais preferencialmente os anticorpos são idênticos na sequência

de aminoácidos. Os anticorpos podem ser ou não glicosilados e ainda assim caírem dentro das fronteiras da invenção. Os anticorpos monoclonais podem ser homogêneos se possuírem uma sequência de aminoácidos idêntica embora possam diferir numa modificação de pós-tradução, *e.g.*, padrão de glicosilação.

Uma "variante" de anticorpo, refere-se aqui a uma molécula que difere na sequência de aminoácidos da sequência de aminoácidos de um anticorpo "parental" em virtude da adição, deleção e/ou substituição de um ou mais resíduo(s) de aminoácidos da sequência do anticorpo parental. Numa forma de realização preferida, o anticorpo variante compreende pelo menos um aminoácido (*e.g.*, desde um até cerca de dez, e preferencialmente 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8) adição, deleção e/ou substituição nas regiões de CDR do anticorpo parental. Identidade ou homologia em relação à sequência do anticorpo variante é aqui definido como a percentagem de resíduos de aminoácidos na sequência do anticorpo variante que são idênticos com os resíduos do anticorpo parental após alinhar as sequências e introduzir intervalos, se necessário, para alcançar a percentagem máxima da identidade de sequência. O anticorpo variante retém a capacidade para se ligar ao antigénio, ou preferencialmente, o epitopo, ao qual o anticorpo parental se liga e preferencialmente possui pelo menos uma propriedade ou bioactividade que é superior à do anticorpo parental. Por exemplo, o anticorpo variante possui preferencialmente uma afinidade de ligação mais forte, uma taxa de eliminação

mais lenta, IC<sub>50</sub> mais baixa ou capacidade aumentada para inibir uma bioactividade do antigénio do que faz o anticorpo parental. Um anticorpo variante de particular interesse aqui referido é aquele que apresenta pelo menos cerca de 2-vezes, preferencialmente pelo menos cerca de 5-vezes, 10-vezes ou 20-vezes aumento numa propriedade ou bioactividade quando comparado com o anticorpo parental.

O anticorpo "parental" aqui referido é aquele que é codificado por uma sequência de aminoácidos utilizada para a preparação de um anticorpo variante. O anticorpo parental pode possuir uma sequência de grelha de origem murínica, mas preferencialmente a sequência de grelha é inteiramente ou substancialmente de origem humana. O anticorpo parental pode ser um anticorpo de murino, quimérico, humanizado ou humano.

O termo "liga-se especificamente", como aqui utilizado, refere-se à situação na qual um membro de um par de ligação específico não se liga significativamente às moléculas diferentes do(s) seu(s) parceiro(s) de ligação específico(s). O termo é também aplicáveis quando e.g., um domínio de ligação ao antigénio de um anticorpo da invenção é específico para um epitopo particular que é realizado por vários antigénios, em cujo caso, o anticorpo específico que contém o domínio de ligação ao antigénio será capaz de se ligar aos vários antigénios que contêm o epitopo. Consequentemente, um anticorpo monoclonal da invenção liga-se especificamente a IL-17 humana (*i.e.*, IL-17A) embora não se

ligue especificamente a IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, IL-17F humanas. Além disso, um anticorpo monoclonal da invenção liga-se especificamente a IL-17 humana e IL-17 de macaco cinomólogo mas não se liga especificamente a IL-17 de rato ou a IL-17 de murino. Além disso, um anticorpo monoclonal da invenção liga-se especificamente a um epitopo de IL-17 humana não-linear ou conformacional, compreendendo os aminoácidos DGNDYH mas não se liga a um epitopo de IL-17 humana que não compreende os aminoácidos DGNDYH.

O termo "liga-se preferencialmente", como aqui utilizado, refere-se à situação em que um anticorpo se liga a um antigénio específico pelo menos cerca de 20% superior, preferencialmente pelo menos cerca de 50%, 2-vezes, 20-vezes, 50-vezes ou 100-vezes superior do que se liga a um antigénio diferente, como medido por uma técnica disponível na técnica, e.g., ELISA de competição ou medição de  $K_D$  com um ensaio de BIACORE ou KTNEXA. Um anticorpo pode ligar-se preferencialmente a um epitopo num antigénio em relação a um epitopo diferente no mesmo antigénio. Consequentemente, um anticorpo da invenção liga-se preferencialmente a IL-17 humana em relação a IL-17 de coelho.

O termo "epitopo" refere-se à porção de uma molécula capaz de ser reconhecida por e ser ligada por um anticorpo em uma ou mais das regiões de ligação ao antigénio do anticorpo. Os epitopos consistem frequentemente num agrupamento de moléculas de superfície quimicamente activas, tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açú-

car e possuem características estruturais tridimensionais específicas assim como características de carga específicas. Por "epitopo de inibição" e/ou "epitopo neutralizador" entende-se um epitopo que, quando no contexto da molécula antigénica intacta e quando ligada por um anticorpo específico para o epitopo, resulta na perda ou na diminuição de uma actividade biológica da molécula *in vivo* ou *in vitro* ou num organismo que contém a molécula.

O termo "epitopo", como aqui utilizado, além disso refere-se a uma porção de um polipéptido possuindo actividade antigénica e/ou imunogénica num animal, preferencialmente um mamífero, e.g., um murganho ou um humano. O termo "epitopo antigénico", como aqui utilizado, é definido como uma porção de um polipéptido ao qual um anticorpo se pode ligar especificamente, como determinado através de qualquer método bem conhecido na técnica, por exemplo, através de imunoensaios convencionais. Os epitopos antigénicos não necessitam necessariamente de ser imunogénicos, mas podem ser imunogénicos. Um "epitopo imunogénico", como aqui utilizado, é definido como uma porção de um polipéptido que induz uma resposta de anticorpo num animal, como determinado através de qualquer método conhecido na art. Um "epitopo não linear" ou "epitopo conformacional" compreende polipéptidos não contíguos (ou aminoácidos) na proteína antigénica à qual um anticorpo específico para o epitopo se liga.

As frases "propriedade biológica" ou "caracterís-

tica biológica", ou os termos "actividade" ou "bioactividade", em referência a um anticorpo da presente invenção, são aqui utilizadas indistintamente e incluem, mas não estão limitadas a, afinidade e especificidade epitopo/antígeno, capacidade para neutralizar ou antagonizam uma actividade de IL-17 *in vivo* ou *in vitro*, IC<sub>50</sub>, estabilidade *in vivo* do anticorpo e as propriedades imunogénicas do anticorpo. Outras propriedades biológicas identificáveis ou características de um anticorpo reconhecidas na técnica incluem, por exemplo, reactividade cruzada, (*i.e.*, com homólogos não humanos do péptido alvo, ou com outras proteínas ou tecidos, geralmente), e a capacidade para preservar níveis de expressão elevados da proteína em células de mamíferos. As propriedades ou características acima mencionadas podem ser observadas, medidas ou avaliadas utilizando técnicas reconhecidas na técnica incluindo, mas não limitadas a, ELISA, ELISA competitiva, análise de ressonância de plasmão de superfície BIACORE ou KJNEXA, ensaios de neutralização *in vitro* ou *in vivo* sem limite, ligação ao receptor, produção e/ou secreção de citocina ou factor de crescimento, transdução de sinal e imuno-histoquímica com secções de tecido de diferentes fontes incluindo humana, primata, ou qualquer outra fonte.

O termo "inibe" ou "neutraliza", como aqui utilizado em relação a uma actividade de um anticorpo da invenção significa a capacidade para antagonizar, proibir, prevenir, restringir, abrandar, interromper, eliminar, parar, ou reverter substancialmente *e.g.*, a progressão ou a

gravidade daquilo que está a ser inibido, incluindo, mas não limitado a, uma actividade biológica (e.g., uma actividade de IL-17) ou propriedade, uma doença ou um estado. A inibição ou neutralização de uma actividade de IL-17 que resulta da ligação de um anticorpo da invenção com IL-17 é preferencialmente pelo menos cerca de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% ou superior.

O termo "isolado", quando utilizado em relação a um ácido nucleico ou proteína (e.g., um anticorpo) refere-se a uma molécula de ácido nucleico ou proteína que é identificada e separada de pelo menos um contaminante com a qual está normalmente associada na sua fonte natural. Preferencialmente, um "anticorpo isolado" é um anticorpo que está substancialmente isento de outros anticorpos possuindo diferentes especificidades antigénicas (e.g., as composições farmacêuticas da invenção compreendem um anticorpo isolado que se liga especificamente a IL-17 e está substancialmente isento de anticorpos que se ligam especificamente aos antígenos diferentes de IL-17).

Os termos "numeração de Kabat" e "marcação de Kabat" são aqui utilizados indistintamente. Estes termos, que são reconhecidos na técnica, refere-se a um sistema de numeração de resíduos de aminoácidos que são mais variáveis (i.e., hipervariáveis) do que outros resíduos de aminoácidos nas regiões variáveis da cadeia pesada e leve de um anticorpo (Kabat, *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci* 190:382-93 (1971); Kabat, *et al.*, *Sequences of proteins of Immunolo-*

gical Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)).

Um polinucleótido está "ligado operacionalmente" a outro polinucleótido quando está colocado numa relação funcional com o outro polinucleótido. Por exemplo, um promotor ou intensificador está ligado operacionalmente a uma sequência codificante se afecta a transcrição da sequência. Um péptido está "ligado operacionalmente" a outro péptido quando os polinucleótidos que os codificam estão ligados operacionalmente, preferencialmente estão na mesma grelha de leitura aberta.

Os termos "indivíduo", "sujeito" e "doente", aqui utilizados indistintamente, referem-se a um mamífero, incluindo, mas não limitados a, murinos, símios, humanos, animais mamíferos de quinta, animais mamíferos de desporto, e animais de companhia mamíferos; preferencialmente o termo refere-se a humanos. Numa certa forma de realização, o sujeito, preferencialmente um mamífero, preferencialmente um humano, é, além disso, caracterizado com uma doença ou distúrbio ou estado que iria beneficiar de uma bioactividade diminuída de IL- 17.

O termo "vector" inclui uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual está ligado incluindo, mas não limitado a, vectores plasmídicos e virais. Certos vectores são capazes de replicação autónoma numa célula hospedeira na qual eles são

introduzidos enquanto outros vectores podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira após introdução na célula hospedeira, e desse modo, são replicados juntamente com o genoma do hospedeiro. Para além disso, certos vectores são capazes de dirigir a expressão dos genes aos quais estão ligados operacionalmente. Esses vectores são aqui referidos como "vectores de expressão recombinantes" (ou simplesmente "vectores de expressão") e os vectores exemplares são bem conhecidos na técnica.

Como aqui utilizadas, as expressões "célula", "célula hospedeira", "linha celular" e "cultura de células" são utilizadas indistintamente e incluem uma célula individual ou cultura de células que é um recipiente de qualquer polinucleótido isolado da invenção ou qualquer vector(es) recombinante(s) compreendendo uma sequência que codifica uma HCVR, LCVR ou anticorpo monoclonal da invenção. As células hospedeiras incluem uma descendência de uma célula hospedeira única, e a descendência pode não ser necessariamente completamente idêntica (em morfologia ou em complemento de DNA total) à célula parental original devido a mutação e/ou alteração natural, acidental, ou deliberada. Uma célula hospedeira inclui células transformadas, transduzidas ou infectadas com um vector recombinante ou um polinucleótido que expressa um anticorpo monoclonal da invenção ou uma sua cadeia leve ou cadeia pesada. Uma célula hospedeira que compreende um vector recombinante da invenção, seja incorporado de forma estável no cromossoma hospedeiro ou não, também pode ser referida

como uma "célula hospedeira recombinante". Células hospedeiras preferidas para utilização na invenção são células CHO (e.g., ATCC CRL-9096), células NSO, células SP2/0, células COS (ATCC e.g., CRL-1650, CRL-1651) e HeLa (ATCC CCL-2). Células hospedeiras adicionais para utilização na invenção incluem células vegetais, células de levedura, outras células de mamíferos e células procarióticas.

#### Caracterização do Anticorpo

A presente invenção refere-se a anticorpos monoclonais isolados que se ligam especificamente a IL-17 humana (*i.e.*, IL-17A) com afinidade elevada. Os anticorpos da invenção são preferencialmente anticorpos quiméricos, humanizados ou humanos ou suas porções de ligação ao antigénio. Para além disso, os anticorpos da invenção neutralizam ou antagonizam pelo menos uma actividade biológica de IL-17 *in vivo* e/ou *in vitro*. A ligação específica de um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção, (incluindo as suas porções de ligação ao antigénio) a IL-17 permite que o referido anticorpo seja utilizado como um agente terapêutico para doenças e distúrbios associados a IL-17, *i.e.*, estados, doenças ou distúrbio que beneficiam da inibição de uma actividade biológica de IL-17.

O epitopo antigénico de IL-17 ao qual os anticorpos da invenção se ligam é um epitopo não linear que

compreende os aminoácidos ADGNVDYHMN (SEQ ID NO: 275), mais preferencialmente os aminoácidos DGNVDYH (SEQ ID NO: 276) de IL-17 humana. Os anticorpos que se ligam ao referido epítipo, ligam-se especificamente e preferencialmente a IL-17 humana e IL-17 de macaco cinomólogo em comparação com a sua ligação a IL-17 de murino ou IL-17 de rato. Os anticorpos monoclonais da invenção ligam-se a IL-17 humana pelo menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ou 100-vezes superior (e.g., afinidade superior ou especificidade superior) do que com a qual se liga a IL-17 de murino ou IL-17 de rato; mais preferencialmente pelo menos 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 ou 600-vezes superior àquela com que se liga a IL-17 de murino ou IL-17 de rato, ainda mais preferencialmente não se liga a IL-17 de murino ou IL-17 de rato a níveis superiores aos níveis de fundo como determinado e.g., através de ensaio de ELISA, ensaio de ELISA de competição ou valores de  $K_D$  num ensaio de BIACORE ou KINEXA.

Numa forma de realização preferida, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal anti-IL-17 que possui uma forte afinidade de ligação para IL-17 humana, *i.e.*, liga-se a IL-17 humana, ou uma porção desta compreendendo DGNVDYH (SEQ ID NO: 276) [*i.e.*, o anticorpo contacta o polipéptido DGNVDYH], com uma afinidade de ligação ( $K_D$ ) para a IL-17 humana inferior a cerca de 7 pM, 6,5 pM ou 6 pM, preferencialmente inferior a cerca de 5,5 pM, 5 pM ou 4,5 pM e mais preferencialmente inferior a cerca de 4 pM. Alternativamente, os anticorpos da invenção são

caracterizados por uma  $K_0$  para a IL-17 humana não superior a cerca de 7 pM, 6,5 pM ou 6 pM, preferencialmente não superior a cerca de 5,5 pM, 5 pM ou 4,5 pM e muito preferencialmente não superior a cerca de 4 pM. As afinidades para o anticorpo podem ser determinadas como descrito nos exemplos aqui referidos abaixo ou outros métodos disponíveis na técnica. Preferencialmente, os anticorpos anti-IL-17 da invenção que possuem uma forte afinidade de ligação, como descrito acima também se ligam ao epitopo da IL-17 humana não linear que compreende os aminoácidos ADGNVDYHMN (SEQ ID NO: 275), mais preferencialmente os aminoácidos DGNVDYH (SEQ ID NO: 276), em que o anticorpo estabelece o contacto com o polipéptido DGNVDYH (SEQ ID NO: 276).

Numa forma de realização, os anticorpos da invenção possuem uma taxa de eliminação ( $k_{off}$ ) para a IL-17 humana inferior a  $5 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  ou  $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . Numa forma de realização preferida, os anticorpos da invenção caracterizados por possuírem uma forte afinidade de ligação para a IL-17 humana como descrito acima ( $K_D$  inferior a cerca de 7 pM ou 6 pM, preferencialmente inferior a cerca de 5 pM ou 4,5 pM e muito preferencialmente inferior a cerca de 4 pM) também possui uma taxa de eliminação ( $k_{off}$ ) para a IL-17 humana inferior a  $5 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  ou  $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  e ainda mais preferencialmente também se liga ao epitopo de IL-17 humana não linear que compreende os aminoácidos ADGNVDYHMN (SEQ ID NO: 275), mais preferencialmente aminoácidos DGNVDYH (SEQ ID NO: 276) da IL-17 humana.

Noutra forma de realização, os anticorpos da invenção possuem uma  $IC_{50}$  inferior a 1 nM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 650 pM, 600 pM, 560 pM, 550 pM ou 500 pM em e.g., um ensaio de repórter de IL-8 *in vitro* ou inferior a cerca de 560 pM num ensaio de repórter de  $GRO\alpha$  (ver Exemplo 6). Numa forma de realização preferida, os anticorpos da invenção são caracterizados por possuírem uma forte afinidade de ligação para a IL-17 humana como descrito acima ( $K_D$  inferior a cerca de 7 pM ou 6 pM, preferencialmente inferior a cerca de 5 pM ou 4,5 pM e muito preferencialmente inferior a cerca de 4 pM) e também possui uma  $IC_{50}$  inferior a 1 nM, 900 pM, 800 pM, 700 pM, 650 pM, 600 pM, 560 pM, 550 pM ou 500 pM em e.g., num ensaio de repórter de IL-8 *in vitro* ou inferior a cerca de 560 pM num ensaio de repórter de  $GRO\alpha$  e ainda mais preferencialmente também possui uma taxa de eliminação ( $k_{off}$ ) para a IL-17 humana inferior a  $5 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  ou  $2 \times 10^{-5} s^{-1}$  e ainda mais preferencialmente também se liga a um epitopo humano de IL-17 não linear que compreende os aminoácidos DGNVDYH (SEQ ID NO: 276) de IL-17 humana em que o anticorpo contacta o polipéptido DGNVDYH (SEQ ID NO: 276).

A forma de realização mais preferida da invenção é um anticorpo anti-IL-17 compreendendo uma sequência de aminoácidos de cadeia leve consistindo na SEQ ID NO: 279 e uma sequência de aminoácidos da cadeia pesada consistindo na SEQ ID NO: 280. Preferencialmente, este anticorpo compreende duas cadeias leves idênticas e duas cadeias

pesadas idênticas. Preferencialmente, a cadeia leve com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 279 é codificada por um ácido nucleico compreendendo a sequência apresentada na SEQ ID NO: 281 (incluindo sequência sinal) ou SEQ ID NO: 283 (sem a sequência sinal). Preferencialmente, a cadeia pesada com a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 280 é codificada por um ácido nucleico compreendendo a sequência apresentada na SEQ ID NO: 282 (incluindo a sequência sinal) ou SEQ ID NO: 284 (sem a sequência sinal).

Os anticorpos monoclonais ("mAbs") podem ser produzidos utilizando o método dos hibridomas largamente conhecido na técnica (ver *e.g.*, Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495, 1975) ou podem ser produzidos através de métodos de DNA recombinante (*e.g.*, como na Patente U.S. N°. 4 816 567). Geralmente, um hibridoma pode ser produzidos fundindo uma linha de células imortais adequada (*e.g.*, uma linha de células de mieloma, tal como SP2/0) com células que produzem anticorpo do animal imunizado. As células que produzem o anticorpo, preferencialmente as do baço ou dos nódulos linfáticos, são obtidas a partir de animais imunizados com o antigénio de interesse. As células da fusão (hibridomas) podem ser isoladas utilizando condições de cultura selectivas, e clonadas sem diluição limitante. O meio de cultura no qual as células de hibridoma são cultivadas é ensaiado para a produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antigénio. Preferencialmente, a especificidade de ligação dos mAbs produzidos pelas células de

hibridoma é determinada através de imunoprecipitação ou através de um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radio-imunoensaio ou ELISA. As células que produzem anticorpos com as propriedades de ligação desejada podem ser seleccionadas por um ensaio adequado. Os métodos para esse isolamento e rastreio são bem conhecidos na técnica.

Podem ser utilizados outros métodos adequados de produção ou isolamento dos anticorpos da invenção, incluindo anticorpos humanos ou artificiais, incluindo, por exemplo, métodos que seleccionam um anticorpo recombinante (e.g., Fv de cadeia simples ou Fab) a partir de uma biblioteca, ou que se baseia na imunização de animais transgénicos (e.g., murganhos) capazes de produzir um reportório de anticorpos humanos (ver e.g., Jakobovits *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90:2551-2555, 1993; Jakobovits *et al*, *Nature*, 362:255-258, 1993; Patente U.S. Números 5 545 806 e 5 545 807).

Os anticorpos de cadeia simples, e anticorpos quiméricos, humanizados ou primatizados (enxertados na CDR), assim como anticorpos de cadeia simples quiméricos ou enxertados na CDR, e semelhantes, compreendendo porções derivadas de espécies diferentes, estão também contemplados na presente invenção e o termo "anticorpo". As várias porções destes anticorpos podem ser unidas em conjunto quimicamente através de técnicas convencionais, sinteticamente, ou podem ser preparados como uma proteína contígua utilizando técnicas de engenharia genética. Por exemplo,

podem ser expressos ácidos nucleicos que codificam uma cadeia quimérica ou humanizada para produzir uma proteína contígua. Ver e.g., Patente U.S. N°. 4 816 567; Patente Europeia N°. 125 023 B1; Patente U.S. N°. 4 816 397; Patente Europeia N°. 120,694 B1; WO 86/01533; Patente Europeia N°. 194 276 B1; Patente U.S. N°. 5 225 539; Patente Europeia N°. 239 400 B1 e Patentes U.S. N°. 5 585 089 e 5 698 762.

Adicionalmente, os fragmentos funcionais dos anticorpos (*i.e.*, fragmentos de ligação ao antigénio), incluindo fragmentos de anticorpos quiméricos, humanizados, primatizados ou de cadeia simples, também podem ser produzidos e caem dentro do âmbito da invenção. Fragmentos funcionais preferidos retêm uma função de ligação ao antigénio de um anticorpo de comprimento total correspondente. Fragmentos funcionais particularmente preferidos retêm a capacidade para inibir uma ou mais funções ou bioactividades características de uma IL-17 madura de mamífero, preferencialmente IL-17 humana, tal como uma actividade de ligação, uma actividade de sinalização, e/ou estimulação ou inibição de uma resposta celular. Por exemplo, numa forma de realização, um fragmento funcional pode inibir a interacção da IL-17 madura com o seu receptor e/ou pode inibir uma ou mais funções mediadas pelo receptor.

Porções do anticorpo capazes de ligação a IL-17 humana incluem, mas não estão limitadas a, fragmentos Fv,

Fab, Fab' e F(ab')<sub>2</sub> e estão contempladas pela invenção. Esses fragmentos podem ser produzidos através de clivagem enzimática ou através de técnicas recombinantes. Por exemplo, a clivagem com papaína ou pepsina de um anticorpo intacto pode criar fragmentos Fab ou F(ab')<sub>2</sub>, respectivamente. A digestão com papaína dos anticorpos produz dois fragmentos de ligação ao antigénio idênticos, denominados fragmentos "Fab", cada um com um sítio de ligação ao antigénio simples. O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (CH1) da cadeia pesada. O tratamento com pepsina produz um fragmento F(ab')<sub>2</sub> que possui dois sítios de combinação de antigénio e é ainda capaz de ligação cruzada com o antigénio.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio completo de reconhecimento e de ligação ao antigénio. Esta região consiste num dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um domínio de cadeia leve em associação estreita, não covalente. É nesta configuração que as três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação ao antigénio na superfície do dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. Colectivamente, as seis CDRs conferem ao anticorpo especificidade de ligação ao antigénio. Para ultrapassar a tendência de domínios HCVR e LCVR ligados não covalentemente no Fv para dissociar quando co-expresso numa célula hospedeira, pode ser construído um fragmento Fv de cadeia simples (scFv) no qual um polipéptido flexível e

adequadamente longo liga a terminal C de HCVR ao terminal N de LCVR ou o terminal C de LCVR ao terminal N de HCVR. Um ligante normalmente utilizado é um péptido de 15 resíduos  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ . Para uma revisão de sFv, ver Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg e Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Os anticorpos também podem ser produzidos numa variedade de formas truncadas utilizando genes de anticorpo nos quais um ou mais códões stop foram introduzidos a jusante do sítio de terminação natural. Por exemplo, um gene quimérico que codifica uma porção de cadeia pesada  $\text{F}(\text{ab}')_2$  pode ser concebido de modo a incluir sequências de DNA que codificam o domínio  $\text{CH}_1$  e a região da dobra da cadeia pesada.

A selecção de fragmentos de anticorpo das bibliotecas utilizando tecnologias de enriquecimento tais como apresentação de fagos (Matthews DJ e Wells JA. *Science*. 260:1113-7, 1993), apresentação de ribossomas (Hanes, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95: 14130-5, 1998), apresentação em bactérias (Samuelson P., et al., *Journal of Biotechnology*. 96: 129-54, 2002) ou apresentação em leveduras (Kieckhefer M.C., et al., *Protein Engineering*, 10:1303-10, 1997) demonstraram ser alternativas bem sucedidas em relação à tecnologia de hibridomas clássica (Revisão: Little M. et al., *Immunology Today*, 21:364-70, 2000).

Anticorpos variantes

Um anticorpo monoclonal de murino ou um anticorpo humano (produzido *e.g.*, num murganho transgênico) criado contra IL-17 pode ser um anticorpo parental. Um anticorpo parental pode ser, além disso, alterado para criar uma forma quimérica ou humanizada do anticorpo ou outra forma variante do anticorpo utilizando métodos disponíveis na técnica, *e.g.*, mutagênese por PCR. Essas variantes quiméricas, humanizadas, ou de outra forma anticorpos variantes, pode servir como anticorpos parentais para além disso variação ou mutagênese. Os anticorpos parentais da invenção podem ser mutagenizados, *e.g.*, no(s) domínio(s) de CDR (ver, *e.g.*, Tabelas 2 e 3) para criar anticorpos variantes que podem ser rastreados quanto à presença de uma propriedade de interesse, *e.g.*, afinidade de ligação ( $K_D$  inferior),  $IC_{50}$ , especificidade, ligação preferencial, etc. Preferencialmente, a propriedade de interesse no anticorpo variante é um melhoramento em relação a essa propriedade no anticorpo parental. Um anticorpo variante por substituição de aminoácido é preferido e possui pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 resíduos de aminoácidos da molécula do anticorpo parental removida e um resíduo diferente inserido no seu lugar. O sítio de maior interesse para mutagênese de substituição é uma ou mais regiões de CDR, mas também estão contempladas alterações de FR. São preferidas substituições conservadoras de aminoácido; embora, para alterações mais substanciais, podem ser introduzidas alterações de aminoácidos não conservadoras e os anticorpos resultantes rastreados para a propriedade de interesse.

Uma forma conveniente para criar variantes de substituição de um anticorpo parental é a maturação de afinidade utilizando apresentação de fagos. Resumidamente, uma molécula de polinucleótido que codifica um anticorpo parental é mutada dentro de uma ou mais regiões de CDR para criar todas as substituições de aminoácidos possíveis em cada resíduo de aminoácido no qual a substituição é desejada. As variantes do anticorpo assim criadas são apresentadas de um modo monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusões com o produto do gene III de M13 empacotado em cada partícula. As variantes do anticorpo de apresentação em fagos são então rastreadas quanto à sua actividade biológica (e.g., afinidade de ligação, especificidade,  $IC_{50}$ ). De modo a identificar os sítios da região de CDR candidata para modificação, podem ser realizados mutagénios de rastreio de alanina para identificar os resíduos da região de CDR contribuindo significativamente para a ligação ao antigénio.

Alternativamente, ou adicionalmente, pode ser benéfico analisar uma estrutura de cristal do complexo antigénio-anticorpo para identificar os pontos de contacto entre o anticorpo e a IL-17. Esses resíduos de contacto e resíduos vizinhos são candidatos para substituição de acordo com as técnicas aqui elaboradas ou conhecidas na técnica. Alternativamente, ou adicionalmente, pode ser realizada mutagénese aleatória ou mutagénese pontual, em uma ou mais moléculas de polinucleótido que codificam pelo

menos uma CDR. A mutagénese pode ser realizada, em um ou mais posições, quer enquanto a CDR está ligada operacionalmente à região de grelha na região variável ou enquanto a CDR é independente de outra sequência de região variável e depois a CDR alterada regressa à região variável utilizando a tecnologia do DNA recombinante. Assim que essas variantes do anticorpo são criadas, o painel de variantes está sujeito a rastreio para uma propriedade ou actividade de interesse e os anticorpos com propriedades superiores em um ou mais ensaios relevantes podem ser seleccionadas for além desse desenvolvimento.

Qualquer resíduo de cisteína não envolvido na manutenção da conformação apropriada de um anticorpo anti-IL-17 da invenção pode ser substituído, geralmente com serina, para melhorar a estabilidade oxidativa da molécula e prevenir ligação cruzada aberrante. Contrariamente, podem ser adicionadas ligação(ões) de cisteína ao anticorpo para melhorar a sua estabilidade (particularmente quando o anticorpo é um fragmento de anticorpo tal como um fragmento Fv).

Outro tipo de variante de aminoácido do anticorpo altera o padrão de glicosilação original do anticorpo. Por alterar entende-se eliminar uma ou mais unidades de carboidrato que se encontra no anticorpo, e/ou adicionar um ou mais sítios de glicosilação que não estão presentes no anticorpo parental. A glicosilação dos anticorpos está tipicamente ligado a N ou ligado a O. Ligado a N refere-se

à ligação da unidade de carbo-hidrato à cadeia lateral de um resíduo de asparagina. As sequências tripeptídicas de asparagina-X-serina e asparagina-X-treonina, em que X é qualquer aminoácido excepto prolina, são as sequências de reconhecimento para a ligação enzimática da unidade de carbo-hidrato à cadeia lateral de asparaginas. Assim, a presença de qualquer uma destas sequências tripeptídicas num polipéptido cria um sítio de glicosilação potencial. Glicosilação ligada a O refere-se à ligação de um dos açúcares de N-acetilgalactosamina, galactose, ou xilose a um ácido hidroxiamino, mais normalmente serina ou treonina, embora também pode ser utilizada 5-hidroxiprolina ou 5-hidroxilisina.

A adição dos sítios de glicosilação ao anticorpo é realizada convenientemente através da alteração da sequência de aminoácidos de modo a que contenha uma ou mais das sequências tripeptídicas acima descritas (para sítios de glicosilação ligados a N). A alteração também pode ser realizada através da adição de, ou substituição por, um ou mais resíduos de serina ou treonina à sequência do anticorpo original (para sítios de glicosilação ligados a O).

#### Sequência

Um anticorpo monoclonal da invenção preferido compreende uma LCVR compreendendo um péptido com uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 178-243 e/ou uma HCVR compreendendo um péptido

com uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 56-121. Numa forma de realização preferida, um anticorpo da invenção compreende uma LCVR compreendendo um péptido com uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 178-243 e compreende ainda uma HCVR compreendendo um péptido com uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 56-121, em que a HCVR e LCVR presentes num anticorpo da invenção existe em conjunto num Fab listado na Tabela 1. Por exemplo, um anticorpo da invenção compreendendo um polipéptido e LCVR com uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 178, preferencialmente compreende ainda um polipéptido de HCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 56, 60, 68-93 e 95. Para além disso, um anticorpo da invenção compreendendo um polipéptido e LCVR com uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 241, preferencialmente compreende ainda um polipéptido de HCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 118 e 106. Um especialista na técnica irá entender que os anticorpos da invenção não estão limitados às sequências específicas de HCVR e LCVR como aqui listado na Tabela 1, mas também incluem variantes destas sequências que, quando presentes num anticorpo anti-IL-17 da invenção, retêm ou melhoram a capacidade de ligação ao antigénio e pelo menos uma outra propriedade funcional do anticorpo parental, e.g., especificidade do epitopo, capacidade para competir com o anticorpo parental para ligação a IL-17, valores de  $IC_{50}$  e/ou  $K_D$  ou  $k_{off}$  para a ligação a IL-17 humana.

Para além disso, um anticorpo monoclonal da invenção é aquele que é inibido de forma competitiva da ligação a IL-17 humana (ou uma sua porção compreendendo DGNVDYH) (SEQ ID NO: 276), por um anticorpo monoclonal de competição em que o anticorpo monoclonal de competição compreende dois polipéptidos com as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NOs: 241 (LCVR) e 118 (HCVR). Essa inibição de competição entre os anticorpos pode ser medida através dos ensaios na técnica, *e.g.*, um ensaio de ELISA de competição.

Preferencialmente, um anticorpo da invenção que compete com o anticorpo de competição definido acima é, além disso, caracterizada por se ligar especificamente a IL-17 humana mas não se ligando a IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E ou IL-17F humanas. Adicionalmente, o anticorpo é, além disso, caracterizado por se ligar especificamente a IL-17 humana e IL-17 de macaco cinomólogo mas não se ligar a IL-17 de rato ou IL-17 de murganho a níveis superiores ao fundo.

Mais preferencialmente, um anticorpo da invenção que compete para a ligação a IL-17 humana com um anticorpo de competição compreendendo as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 241 e 118 é, além disso, caracterizado por se ligar a um epítipo de IL-17 humana não linear compreendendo os aminoácidos DGNVDYH (SEQ ID NO: 276). Ainda mais preferencialmente, um anticorpo da

invenção que compete para a ligação a IL-17 humana com um anticorpo de competição que compreende as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NOs: 241 e 118 é, além disso, caracterizado por possuir uma  $K_D$  para a IL-17 humana inferior a cerca de 7 pM, 6,5 pM ou 6 pM, preferencialmente inferior a cerca de 5,5 pM, 5 pM ou 4,5 pM e muito preferencialmente inferior a cerca de 4 pM e/ou é caracterizado por uma  $IC_{50}$ , preferencialmente num ensaio de repórter de IL-8 *in vitro*, isto é, inferior a 700 pM, 650 pM, 600 pM, 560 pM, 550 pM ou 500 pM, ou por uma  $IC_{50}$  num ensaio de repórter *in vitro* de  $GRO\alpha$  inferior a cerca de 560 pM, e/ou possui uma taxa de eliminação ( $k_{off}$ ) para a IL-17 humana inferior a  $5 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  ou  $2 \times 10^{-5} s^{-1}$ .

Numa forma de realização, um anticorpo anti-IL-17 da invenção possui uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada compreende regiões CDR com as seguintes sequências de aminoácidos: CDRH1 (SEQ ID NO: 244), CDRH2 (SEQ ID NO: 245), e CDRH3 (SEQ ID NO: 246); e/ou em que a região variável da cadeia leve compreende as regiões de CDR com as seguintes sequências de aminoácidos: CDRL1 (SEQ ID NO: 247), CDRL2 (SEQ ID NO: 248) e CDRL3 (SEQ ID NO: 249). Preferencialmente, as seis CDRs de um anticorpo da invenção existe em conjunto como num Fab aqui listado na Tabela 1. Ainda mais preferencialmente, as CDRs de cadeia pesada estão no contexto das seguintes sequências de grelha: FR1 com SEQ ID NO: 262, FR2 com SEQ ID NO: 263,

FR3 com SEQ ID NO: 264 e FR4 com SEQ ID NO: 265 e as CDRs de cadeia leve estão no contexto das seguintes sequências de grelha: FR1 com SEQ ID NO: 266, FR2 com SEQ ID NO: 267, FR3 com SEQ ID NO: 268 e FR4 com SEQ ID NO: 269, em que a ordem do terminal amino é FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

Está, além disso, contemplado que um anticorpo anti-IL-17 da invenção compreende uma HCVR compreendendo uma CDRH1 compreendendo uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 11-28, e/ou uma CDRH2 compreendendo uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 29-32, e/ou uma CDRH3 compreendendo uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 33-55 e 261. Noutra forma de realização, um anticorpo anti-IL-17 da invenção compreende uma LCVR compreendendo uma CDRL1 compreendendo uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 122-149, e/ou uma CDRL2 compreendendo uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 150-167, e/ou uma CDRL3 compreendendo uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 168-177. Numa forma de realização preferida, um anticorpo anti-IL-17 da invenção compreende uma HCVR compreendendo uma CDRH1 compreendendo uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 11-28, e/ou uma CDRH2 compreendendo uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 29-32, e/ou uma CDRH3 compreendendo uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs:

33-55 e 261, e compreende ainda uma LCVR compreendendo uma CDRL1 compreendendo uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 122-149, e/ou uma CDRL2 compreendendo uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 150-167, e/ou uma CDRL3 compreendendo uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 168-177.

A composição compreendendo uma CDR da invenção será geralmente uma sequência de cadeia pesada ou leve do anticorpo ou uma sua porção substancial, na qual a CDR está localizada numa localização consistente com a numeração de Kabat. As três regiões de CDR para cada cadeia, pesada e leve, são fornecidas numa região em grelha como uma sequência contígua representada pela seguinte fórmula: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. A FR1, FR2, FR3 e FR4 de cadeia pesada ou cadeia leve combinam-se para formar a região de grelha completa de um anticorpo quando disposta como uma sequência contígua com as CDRs na ordem referida. Preferencialmente, as regiões de grelha de um anticorpo da invenção são de origem humana ou de origem substancialmente humana (*i.e.*, superior a cerca de 80, 82, 85, 87, 90, 92, 95, 97%).

Num anticorpo humanizado para utilização terapêutica em humanos, a sequência de grelha é preferencialmente inteiramente ou substancialmente de origem humana. Preferencialmente, a região de grelha da cadeia leve de um anticorpo humanizado, humano ou quimérico da

invenção compreende FR1 com SEQ ID NO: 266, FR2 com SEQ ID NO: 267, FR3 com SEQ ID NO: 268 e FR4 com SEQ ID NO: 269. Preferencialmente, a região de grelha de cadeia pesada de um anticorpo humanizado, humano ou quimérico da invenção compreende FR1 com SEQ ID NO: 262, FR2 com SEQ ID NO: 263, FR3 com SEQ ID NO: 264, e FR4 com SEQ ID NO: 265. Por exemplo, uma forma de realização preferida de LCVR do anticorpo 126 da invenção, como descrito nas Tabelas 1, 2 e 3 aqui compreende (polipéptidos em ordem a partir do terminal N) FR1 com SEQ ID NO: 266, CDR1 com SEQ ID NO: 131, FR2 com SEQ ID NO: 267, CDR2 com SEQ ID NO: 167, FR3 com SEQ ID NO: 268, CDR3 com SEQ ID NO: 168 e FR4 com SEQ ID NO: 269. A sequência inteira de LCVR, ligada operacionalmente a uma região constante de kapa humana é como apresentada na SEQ ID NO: 274. Além disso, uma forma de realização preferida de HCVR do anticorpo 126 da invenção compreende (em ordem a partir do terminal N) FR1 com SEQ ID NO: 262, CDR1 com SEQ ID NO: 26, FR2 com SEQ ID NO: 262, CDR2 com SEQ ID NO: 30, FR3 com SEQ ID NO: 264, CDR3 com SEQ ID NO: 52 e FR4 com SEQ ID NO: 265. A sequência inteira de HCVR, ligada operacionalmente a uma região de Fc IgG<sub>4</sub> humana é como apresentada na SEQ ID NO: 273.

Numa forma de realização, um anticorpo anti-IL-17 da invenção, em que a totalidade ou uma porção da região variável está limitada por uma sequência particular como aqui apresentada por uma SEQ ID NO (ver, e.g., Tabelas 1-3) é além disso caracterizada por ser um anticorpo quimérico, humanizado, ou totalmente humano ou sua porção de ligação

ao antigénio que antagoniza ou neutraliza pelo menos uma actividade de IL-17 humana *in vivo* ou *in vitro*. Um anticorpo de IL-17 da invenção, em que a totalidade ou uma porção da região variável está limitada por uma sequência particular como aqui apresentado por uma SEQ ID NO é além disso caracterizado por se ligar especificamente a IL-17 humana mas não se ligar a IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E ou IL-17F humana. Adicionalmente, o anticorpo é, além disso, caracterizado por se ligar especificamente a IL-17 humana e IL-17 de macaco cinomólogo mas não se ligar a IL-17 de rato ou a IL-17 de murganho a níveis superiores ao ruído.

Mais preferencialmente, esse anticorpo é, além disso, caracterizado por se ligar a um epitopo de IL-17 humana não linear compreendendo os aminoácidos DGNVDYH (SEQ ID NO: 276) em que o anticorpo estabelece contacto com o polipéptido com SEQ ID NO: 276. Ainda mais preferencialmente, esse anticorpo é além disso caracterizado por possuir uma  $K_D$  para a IL-17 humana inferior a cerca de 7 pM, 6,5 pM ou 6 pM, preferencialmente inferior a cerca de 5,5 pM, 5 pM ou 4,5 pM e muito preferencialmente inferior a cerca de 4 pM e/ou é caracterizado por uma  $IC_{50}$ , preferencialmente num ensaio de repórter de IL-8 *in vitro*, isto é, inferior a 700 pM, 650 pM, 600 pM, 560 pM, 550 pM ou 500 pM, ou uma  $IC_{50}$  num ensaio de repórter *in vitro* de  $GR\alpha$  inferior a cerca de 560 pM, e/ou possui uma taxa de eliminação ( $k_{off}$ ) para IL-17 humana inferior a  $5 \times 10^{-5}$ ,  $4 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  ou  $2 \times 10^{-5} s^{-1}$ .

Expressão de Anticorpo

A presente invenção é também dirigida a linhas celulares que expressam um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção ou uma porção deste. A criação e o isolamento de linhas celulares que produzem um anticorpo monoclonal da invenção podem ser conseguidas utilizando técnicas convencionais conhecidas na técnica. Linhas celulares preferidas incluem COS, CHO, SP2/0, NS0 e de levedura (disponíveis em repositórios públicos, tais como ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA).

Pode ser utilizada uma vasta variedade de sistemas de expressão hospedeiros para expressar um anticorpo da presente invenção incluindo sistemas de expressão procarióticos e eucarióticos (tais como leveduras, baculovírus, plantas, mamíferos e outras células animais, animais transgênicos, e células de hibridoma), assim como sistemas de expressão de apresentação de fagos. Um exemplo de um vector de expressão bacteriana adequado é o pUC 19 e um vector de expressão eucariótico adequado é um vector pcDNA3.1 modificado com um sistema de selecção de dhfr enfraquecido. Outros sistemas de expressão de anticorpo são também conhecidos na técnica e estão aqui contemplados.

Um anticorpo da invenção pode ser preparado através da expressão recombinante de genes da cadeia pesada e leve da imunoglobulina numa célula hospedeira. Para expressar um anticorpo de forma recombinante, uma célula

hospedeira é transformada, transduzida, infectada ou afim com um ou mais vectores de expressão recombinante contendo fragmentos de DNA que codificam as cadeias leves e/ou pesadas da imunoglobulina do anticorpo de modo a que as cadeias leves e/ou pesadas sejam expressas na célula hospedeira. A cadeia pesada e a cadeia leve podem ser expressas independentemente a partir de diferentes promotores aos quais estão ligados operacionalmente num vector ou, alternativamente, a cadeia pesada e a cadeia leve podem ser expressas independentemente a partir de diferentes promotores aos quais estão ligados operacionalmente em dois vectores - um expressando a cadeia pesada e um expressando a cadeia leve. Opcionalmente, a cadeia pesada e a cadeia leve podem ser expressos em diferentes células hospedeiras. Preferencialmente, os anticorpos recombinantes são secretados para o meio no qual as células hospedeiras são cultivadas, a partir do qual os anticorpos podem ser recuperados ou purificados. As metodologias de DNA recombinante convencionais são utilizadas para obter genes da cadeia pesada e leve do anticorpo, incorporar estes genes nos vectores de expressão recombinantes, e introduzir os vectores nas células hospedeiras. Essas tecnologias de DNA recombinante convencionais são descritas, por exemplo, em Sambrook, Fritsch, e Maniatis (Eds.), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Ausubel, *et al* (Eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1989.

Um DNA isolado que codifica uma região HCVR pode ser convertido num gene de cadeia pesada de comprimento total ligando operacionalmente o DNA que codifica HCVR a outra molécula de DNA que codifica a regiões constantes de cadeia pesada (CH1, CH2, e CH3). As sequências dos genes da região constante de cadeia pesada humana são conhecidas na técnica. Ver, *e.g.*, Kabat, *et al*, Sequences of proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991). Os fragmentos de DNA que englobam estas regiões podem ser obtidos *e.g.*, através de amplificação convencional por PCR. A região constante de cadeia pesada pode ser de qualquer tipo, (*e.g.*, IgG, IgA, IgE, IgM ou IgD), classe (*e.g.*, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>) ou subclasse de região constante e qualquer sua variante alotípica como descrito em Kabat (*supra*). Alternativamente, a porção de ligação ao antigénio pode ser um fragmento Fab, fragmento Fab', fragmento F(ab')<sub>2</sub>, Fd, ou um fragmento Fv de cadeia simples (scFv). Para um gene da cadeia pesada do fragmento Fab, o DNA que codifica HCVR pode estar ligado operacionalmente a outra molécula de DNA que codifica apenas uma região constante de CH<sub>1</sub> de cadeia pesada.

Um DNA isolado que codifica uma região LCVR pode ser convertido num gene de cadeia leve de comprimento total (assim como num gene de cadeia leve de Fab) através da ligação operacional do DNA que codifica LCVR a outra molécula de DNA que codifica uma região constante da cadeia leve, CL. As sequências dos genes da região constante

humana da cadeia leve são conhecidas na técnica. Ver, e.g., Kabat, *supra*. Os fragmentos de DNA que englobam estas regiões podem ser obtidas através de amplificação de PCR convencional. A região constante da cadeia leve pode ser uma região constante kapa ou lambda.

Para criar um gene de scFv, os fragmentos de DNA que codificam HCVR e LCVR estão ligados operacionalmente a outro fragmento que codifica um ligante flexível, e.g., codificando a sequência de aminoácidos (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>, de modo a que as sequências de HCVR e LCVR possam ser expressas como uma proteína de cadeia simples contígua, com as regiões LCVR e HCVR unidas pelo ligante flexível. Ver, e.g., Bird, *et al*, *Science* 242:423-6, 1988; Huston, *et al*, *Proc Natl. Acad. Sci USA* 85:5879-83, 1988; McCafferty, *et al*, *Nature* 348:552-4, 1990.

Numa forma de realização, a invenção proporciona um vector, preferencialmente (mas não limitado a) um plasmídeo, um vector de expressão recombinante, um vector de expressão em levedura, ou um vector de expressão retroviral compreendendo um polinucleótido que codifica um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção. Alternativamente, um vector da invenção compreende a polinucleótido que codifica um LCVR e/ou um polinucleótido que codifica uma HCVR da invenção. Quando ambas as sequências que codificam uma LCVR e uma HCVR estão presentes no mesmo vector, elas podem ser transcritas independentemente, cada uma de um promotor separado ao qual está ligado operacio-

nalmente. Se as sequências que codificam a LCVR e a HCVR estão presentes no mesmo vector e são transcritos a partir de um promotor ao qual estão ambas ligadas operacionalmente, a LCVR pode estar 5' em relação a HCVR ou a LCVR pode estar em 3' em relação a HCVR, para além disso, a região que codifica LCVR e HCVR no vector pode ser separada por uma sequência ligante de qualquer tamanho ou conteúdo, preferencialmente esse ligante, quando presente, é um polinucleótido que codifica um sítio de entrada do ribossoma interno.

Para expressar um anticorpo da invenção, um DNA que codifica uma cadeia leve e/ou pesada parcial ou de comprimento total, obtido como descrito acima, é inserido num vector de expressão de modo a que o gene está ligado operacionalmente a sequências de controlo de transcrição e tradução. O vector de expressão e as sequências de controlo de expressão são seleccionados para serem compatíveis com a célula de expressão hospedeira utilizada. O gene do anticorpo de cadeia leve e o gene do anticorpo de cadeia pesada pode ser inserido em vectores separados ou, mais tipicamente, ambos os genes são inseridos no mesmo vector de expressão. Os genes do anticorpo são inseridos no vector de expressão através de métodos convencionais. Adicionalmente, o vector de expressão recombinante pode codificar um péptido sinal que facilita a secreção da cadeia leve ou pesada do anticorpo monoclonal anti-IL-17 de uma célula hospedeira. O gene da cadeia leve e/ou pesada do anticorpo monoclonal anti-IL-17 pode ser clonado no vector de modo a

que o péptido sinal é ligado operacionalmente em grelha ao terminal amino do gene da cadeia de anticorpo. O péptido sinal pode ser um péptido sinal de imunoglobulina ou um péptido sinal heterólogo.

Adicionalmente ao(s) gene(s) da cadeia pesada e leve do anticorpo, um vector de expressão recombinante da invenção comporta sequências de regulação que controla a expressão do(s) gene(s) da cadeia de anticorpo numa célula hospedeira. O termo "sequência de regulação" pretende incluir promotores, intensificadores e outros elementos de controlo de expressão (e.g., sinais de poliadenilação), como necessário, que controlam a transcrição ou tradução do gene(s) da cadeia do anticorpo. A concepção do vector de expressão, incluindo a selecção de sequências de regulação pode depender de factores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão da proteína desejada. As sequências de regulação preferidas para células hospedeiras de expressão de mamíferos incluem elementos virais que dirigem níveis elevados de expressão de proteína em células de mamíferos, tais como promotores e/ou intensificadores derivados de citomegalovírus (CMV), Vírus Símio 40 (SV40), adenovírus, (e.g., o promotor tardio principal de adenovírus (AdMLP)) e vírus polio.

Adicionalmente aos genes da cadeia pesada e/ou leve do anticorpo e sequências reguladoras, os vectores de expressão recombinantes da invenção podem conter adicionalmente sequências, tais como as sequências que regulam a

replicação do vector em células hospedeiras (e.g., origens de replicação) e um ou mais genes marcadores de selecção. O gene marcador de selecção facilita a selecção de células hospedeiras nas quais o vector foi introduzido. Por exemplo, tipicamente o gene marcador de selecção confere resistência aos fármacos, tais como G418, higromicina, ou metotrexato, numa célula hospedeira na qual o vector foi introduzido. Genes marcadores de selecção preferidos incluem o gene da redutase de di-hidrofolato (*dhfr*) (para utilização em células hospedeiras *dhfr*-menos com selecção/amplificação em metotrexato), o gene *neo* (para selecção de G418), e sintetase de glutamina (GS) numa linha celular GS-negativa (tal como NS0) para selecção/amplificação.

Para expressão das cadeias leves e/ou pesadas, o(s) vector(es) de expressão que codificam as cadeias pesada e/ou leves é/são introduzidos numa célula hospedeira através de técnicas convencionais e.g., electroporação, precipitação com fosfato de cálcio, transfecção em DEAE-dextrano, transdução, infecção e semelhantes. Embora seja teoricamente possível expressar os anticorpos da invenção em qualquer uma das células procarióticas ou eucarióticas, são preferidas células eucarióticas, e muito preferencialmente células hospedeiras de mamíferos, porque essas células têm maior probabilidade de montar e secretar um anticorpo imunologicamente activo e montado de forma adequada. Células hospedeiras de mamíferos preferidas para expressar os anticorpos recombinantes da invenção incluem células de Ovário de Hamster Chinês (células CHO)

[incluindo células CHO *dhfr* menos, descritas em Urlaub e Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-20, 1980, utilizadas com um marcador seleccionável de DHFR, e.g., como descrito em Kaufman e Sharp, *J. Mol. Biol.* 159:601-21, 1982] células de mieloma NSO, células COS, e células SP2/0. Quando os vectores de expressão recombinantes que codificam genes de anticorpo são introduzidos em células hospedeiras de mamíferos, os anticorpos são produzidos através da cultura das células hospedeiras durante um período de tempo suficiente para permitir a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferencialmente, a secreção do anticorpo no meio de cultura no qual as células hospedeiras são cultivadas em condições apropriadas conhecidas na técnica. Os anticorpos podem ser recuperados a partir da célula hospedeira e/ou do meio de cultura utilizando métodos de purificação convencionais.

Também podem ser utilizadas células hospedeiras para produzir porções, ou fragmentos, de anticorpos intactos, e.g., fragmentos Fab ou moléculas de scFv através de técnicas que são convencionais. Será entendido por um técnico especialista que variações no processo acima descrito estão dentro do âmbito da presente invenção. Por exemplo, pode ser desejável transfectar uma célula hospedeira com DNA que codifica a cadeia leve ou a cadeia pesada de um anticorpo desta invenção. A tecnologia do DNA recombinante também pode ser utilizada para remover algum ou todo o DNA que codifica qualquer uma ou ambas as cadeias leve e pesada que não é necessariamente para ligação a IL-

17. As moléculas expressas a partir dessas moléculas de DNA truncado estão também compreendidas pelos anticorpos da invenção.

A invenção proporciona uma célula hospedeira compreendendo uma molécula de ácido nucleico da presente invenção. Preferencialmente, a célula hospedeira da invenção compreende um ou mais vectores ou construções compreendendo uma molécula de ácido nucleico da presente invenção. A célula hospedeira da invenção é uma célula na qual foi introduzido um vector da invenção, compreendendo o referido vector um polinucleótido que codifica uma LCVR de um anticorpo da invenção e/ou um polinucleótido que codifica uma HCVR da invenção. A invenção também proporciona uma célula hospedeira na qual foram introduzidos dois vectores da invenção; um compreendendo um polinucleótido que codifica uma LCVR de um anticorpo da invenção e um compreendendo um polinucleótido que codifica uma HCVR presente num anticorpo da invenção e cada um ligado operacionalmente a uma sequência de promotor. Os tipos de célula hospedeira incluem células de mamífero, bactérias, plantas e leveduras. Preferencialmente a célula hospedeira é uma célula CHO, uma célula COS, uma célula SP2/0, uma célula NSO, uma célula de levedura ou um derivado ou descendência de qualquer tipo de célula preferida.

Num sistema preferido para a expressão recombinante de um anticorpo da invenção, um vector de expressão recombinante que codifica ambas a cadeia pesada do anti-

corpo e a cadeia leve do anticorpo é introduzido em células CHO dhfr-menos através de e.g., transfecção mediada por fosfato de cálcio. No vector de expressão recombinante, os genes da cadeia pesada e leve do anticorpo são cada um ligado operacionalmente a elementos de regulação de intensificador/promotor (e.g., derivados de SV40, CMV, adenovírus e semelhantes, tais como um elemento de regulação intensificador CMV/promotor de AdMLP ou um elemento de regulação intensificador de SV40/promotor de AdMLP) para conduzir a níveis elevados de transcrição dos genes. O vector de expressão recombinante também contém um gene *dhfr*, que permite a selecção de células CHO que foram transfectadas com o vector utilizando selecção com metotrexato/amplificação. As células hospedeiras transformantes seleccionadas são cultivadas para permitir a expressão das cadeias pesada e leve do anticorpo e o anticorpo intacto é recuperado a partir do meio de cultura. São utilizadas técnicas de biologia molecular convencionais para preparar o vector de expressão recombinante, transfectar as células hospedeiras, seleccionar os transformantes, cultivar as células hospedeiras e recuperar o anticorpo a partir do meio de cultura. Os anticorpos, ou suas porções de ligação ao antigénio, da invenção podem ser expressos num animal (e.g., um murganho) que seja transgénico para genes de imunoglobulina humana (ver, e.g., Taylor, et al., *Nucleic Acids Res.* 20:6287-95, 1992).

Uma vez expressos, os anticorpos intactos, seus dímeros, cadeias leves e pesadas individuais, ou outras

formas de imunoglobulina da presente invenção podem ser purificadas de acordo com processos convencionais na técnica, incluindo precipitação com sulfato de amónio, cromatografia em coluna de permuta iónica, de afinidade, de fase reversa, de interacção hidrofóbica, electroforese em gel e semelhantes. São preferidas imunoglobulinas substancialmente puras de pelo menos cerca de 90%, 92%, 94% ou 96% homogeneidade, e mais preferidas as de 98 até 99% ou mais de homogeneidade, para utilizações farmacêuticas. Uma vez purificados, parcialmente ou até à homogeneidade como desejado, os péptidos podem ser então utilizados terapêuticamente ou profilacticamente, como aqui descrito.

#### Anticorpo Quimérico

Como aqui utilizado, o termo "anticorpo quimérico" inclui imunoglobulinas monovalentes, divalentes ou polivalentes. Um anticorpo quimérico monovalente é um dímero formado por uma cadeia pesada quimérica associada através de ligações persulfureto com uma cadeia leve quimérica. Um anticorpo quimérico divalente é um tetrâmero formado por dois dímeros de cadeia pesada-cadeia leve associados através de pelo menos uma ligação persulfureto.

Uma cadeia pesada quimérica de um anticorpo compreende uma região de ligação ao antigénio derivada da cadeia pesada de um anticorpo não humano específico para IL-17, que está ligado operacionalmente a pelo menos uma porção de uma região constante de cadeia pesada humana, ou

substancialmente humana (ou espécie diferente daquela a partir da qual a região de ligação ao antigénio foi derivada), tal como CH1 ou CH2, ou preferencialmente a uma região constante de cadeia pesada de comprimento total. Uma cadeia leve quimérica de um anticorpo para utilização em humanos compreende uma região de ligação ao antigénio derivada inteiramente ou substancialmente da cadeia leve de um anticorpo não humano específico para IL-17, ligado operacionalmente a pelo menos uma porção de uma região constante da cadeia leve (CL) humana, ou substancialmente humana (ou espécie diferente daquela a partir da qual a região de ligação ao antigénio foi derivada), ou preferencialmente a uma região constante de cadeia leve de comprimento total. Anticorpos, fragmentos ou derivados possuindo cadeias pesadas e cadeias leves quiméricas da mesma ou de diferente especificidade de ligação a região variável, também pode ser preparada através da associação apropriada das cadeias de polipéptido individual, de acordo com passos conhecidos do método.

Com esta abordagem, os hospedeiros que expressam cadeias pesadas quiméricas são cultivados separadamente a partir dos hospedeiros que expressam cadeias leves quiméricas, e as cadeias de imunoglobulina são recuperadas separadamente e depois associadas. Alternativamente, os hospedeiros podem ser co-cultivados e as cadeias deixadas associar-se espontaneamente no meio de cultura, seguido pela recuperação da imunoglobulina montada ou fragmento. São conhecidos na técnica métodos para produzir anticorpos

quiméricos (ver, e.g., Patente U.S. Nos.: 6 284 471; 5 807 715; 4 816 567; e 4 816 397).

#### Anticorpos Humanizados

Preferencialmente, um anticorpo da invenção a ser utilizado para objectivos terapêuticos, teriam a sequência da região de grelha e constante (até ao ponto de existir no anticorpo) derivado do mamífero no qual deve ser utilizado como um agente terapêutico de modo a diminuir a possibilidade de o mamífero induzir uma resposta imunitária contra o anticorpo terapêutico. Os anticorpos humanizados são de particular interesse uma vez que são considerados como sendo valiosos para aplicação terapêutica e evitar a resposta de anticorpo anti-murganho humano frequentemente observada com anticorpos de roedores. Adicionalmente, em anticorpos humanizados, a porção efectora do anticorpo é de origem humana de modo a que possa interagir melhor com as outras partes do sistema imunitário humano (e.g., destruir as células alvo mais eficientemente através de citotoxicidade dependente do complemento ou citotoxicidade celular dependente do anticorpo). Também, os anticorpos humanizados injectados podem possuir uma semi-vida mais parecida com aquela dos anticorpos humanos que ocorrem naturalmente do que e.g., anticorpos de murino, permitindo desse modo que sejam administradas doses mais pequenas e menos frequentes. O termo "anticorpo humanizado", como aqui utilizado, refere-se a um anticorpo compreendendo porções de anticorpos de origem diferente, em que pelo menos uma

porção é de origem humana. Por exemplo, o anticorpo humanizado pode compreender porções derivadas de um anticorpo de origem não humana com a especificidade requerida, tal como um murganho, e de um anticorpo de origem humana, unidas em conjunto quimicamente através de técnicas convencionais (e.g., sintéticas) ou preparado como um polipéptido contíguo utilizando técnicas de engenharia genética.

Preferencialmente, um "anticorpo humanizado" possui CDRs que têm origem (ou têm substancialmente origem) a partir de um anticorpo não humano (preferencialmente um anticorpo monoclonal de murganho) enquanto a região da grelha é constante, até ao ponto de estar presente, (ou uma sua porção significativa ou substancial, i.e., pelo menos cerca de 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) são codificados pela informação da sequência de ácido nucleico que ocorre na região da imunoglobulina da linha germinal humana (ver, e.g., the International ImMunoGeneTics Database) ou nas suas formas recombinadas ou mutadas quer os referidos anticorpos sejam produzidos numa célula humana ou não.

As CDRs de um anticorpo humanizado podem ser alteradas ou optimizadas a partir das CDRs de um anticorpo parental não humano a partir do qual tiveram origem para criar as propriedades desejadas, e.g., especificidade, afinidade e/ou ligação preferencial. As CDRs alteradas ou optimizadas podem possuir substituições, adições e/ou deleções de aminoácidos quando comparadas com as CDRs

parentais, preferencialmente cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 total nos seis domínios de CDR. Por exemplo, as posições de aminoácidos das CDRs que estão sublinhadas e em impressão a negrito nas Tabelas 2 e 3 são posições que foram alteradas a partir das CDRs como apresentado na Fab 1 das Tabelas 2 e 3. Alternativamente, o anticorpo de murino 2321 pode ser um anticorpo parental para a comparação das CDRs de um anticorpo da invenção.

Formas humanizadas de anticorpos não humanos (e.g., murino) incluem um anticorpo intacto, um anticorpo substancialmente intacto, uma porção de um anticorpo compreendendo um sítio de ligação ao antigénio, ou uma porção de um anticorpo compreendendo um fragmento Fab, fragmento Fab',  $F(ab')_2$ , ou um fragmento Fv de cadeia simples. Anticorpos humanizados contêm preferencialmente uma sequência mínima derivada de imunoglobulina não humana. Os anticorpos humanizados também podem compreender resíduos que não se encontram nem no anticorpo recipiente nem nas sequências de CDR ou de grelha importadas. Em geral, o anticorpo humanizado irá compreender substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todos ou substancialmente todos os aminoácidos nas regiões de CDR correspondem aqueles de uma imunoglobulina não humana e todos ou substancialmente todos os aminoácidos nas regiões FR são aqueles de uma sequência de imunoglobulina humana de consenso. O anticorpo humanizado também compreende optimamente pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela

de uma imunoglobulina humana. [Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525, 1986; Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329, 1988; e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol*, 2:593-596, 1992].

Os anticorpos humanizados podem ser sujeitos a mutagênese *in vitro* utilizando métodos de utilização de rotina na técnica (ou, quando é utilizado um animal transgênico para sequências de Ig humanas, mutagênese somática *in vivo*) e, desse modo, as sequências de aminoácido da região de grelha das regiões HCVR e LCVR dos anticorpos humanizados recombinantes são sequências que, embora derivados daqueles relacionados com sequências de HCVR e LCVR da linha germinal humana, podem não existir naturalmente no repertório da linha germinal de anticorpo humano *in vivo*. Está contemplado que essas sequências de aminoácidos das regiões de grelha de HCVR e LCVR dos anticorpos humanizados recombinantes são pelo menos 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 98% ou mais preferencialmente pelo menos 99% idênticos a uma sequência de linha germinal humana. Preferencialmente, os resíduos de grelha do anticorpo parental (e.g., anticorpo de murino ou de um modo geral o anticorpo a partir do qual o anticorpo humanizado é derivado) que mantém ou afecta estruturas do sítio de combinação serão retidos. Estes resíduos podem ser identificados e.g., através de cristalografia de raios X do anticorpo parental ou fragmento Fab, identificando desse modo a estrutura tridimensional do sítio de ligação ao antigénio. Uma estratégia para humanizar os anticorpos é escolher uma sequência de linha germinal humana com a maior

homologia com a grelha do anticorpo parental que a grelha para receber as CDRs dadoras. Esta abordagem de linha germinal é baseada na mesma lógica que a estratégia de melhor ajuste, mas apenas as sequências da linha germinal são pesquisadas nas bases de dados.

O anticorpo humanizado da presente invenção pode compreender ou ser derivada de uma grelha de cadeia leve da linha germinal humana. Em formas de realização particulares a sequência da linha germinal da cadeia leve é seleccionada a partir de sequências VK humanas, incluindo, mas não limitadas a, A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4, e O8. Em certas formas de realização, esta grelha da linha germinal de cadeia leve humana é seleccionada a partir de V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-2, V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4, e V5-6.

Noutras formas de realização, o anticorpo humanizado da presente invenção pode compreender ou ser derivada de uma grelha de cadeia pesada de linha germinal humana. Em formas de realização particulares, esta grelha da linha germinal da cadeia pesada humana é seleccionada a partir de VH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-

13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1, e VH7-81. Ver a PCT WO 2005/005604 para uma descrição das sequências de linha germinal diferentes.

Em formas de realização particulares, a região variável da cadeia leve e/ou região variável de cadeia pesada compreendem uma região de grelha ou pelo menos uma porção de uma região de grelha (e.g., contendo 2 ou 3 sub-regiões, tais como FR2 e FR3). Em certas formas de realização, pelo menos FRL1, FRL2, FRL3, ou FRL4 é totalmente humana. Noutras formas de realização, pelo menos FRH1, FRH2, FRH3, ou FRH4 é totalmente humana. Em algumas formas de realização, pelo menos FRL1, FRL2, FRL3, ou FRL4 é uma sequência da linha germinal (e.g., linha germinal humana) ou compreende sequências de consenso humanas para a grelha particular. Noutras formas de realização, pelo menos FRH1, FRH2, FRH3, ou FRH4 é uma sequência de linha germinal (e.g., linha germinal humana) ou compreende sequências de consenso humanas para a grelha particular. Em formas de realização preferidas, toda a região de grelha é uma região de grelha humana.

Em geral, os anticorpos humanizados podem ser produzidos através da obtenção de sequências de ácido nucleico que codificam a HCVR e LCVR de um anticorpo, e.g., um anticorpo de murino ou o anticorpo produzido por um

hibridoma, que se liga ao epitopo de IL-17 da invenção, identificando as CDRs na referida HCVR e LCVR (não humana), e enxertando essa sequência de ácido nucleico que codifica CDR para uma sequências de ácido nucleico que codifica a grelha humana. Opcionalmente, uma região CDR pode ser otimizada através de mutagenização aleatória ou em particular localizações de modo a substituir um ou mais aminoácidos na CDR com um aminoácido diferente antes de enxertar a região CDR para a região de grelha. Alternativamente, pode ser obtida uma região CDR subsequente à inserção na região de grelha humana utilizando métodos disponíveis para um especialista na técnica. Preferencialmente, as sequências de aminoácido de grelha humana são seleccionadas de modo a que o anticorpo resultante seja provavelmente adequado para administração *in vivo* em humanos. Isto pode ser determinado, *e.g.*, com base na utilização prévia de anticorpos contendo essa sequência de grelha humana. Preferencialmente, A sequência de grelha humana não irá ela própria ser significativamente imunogénica.

Alternativamente, as sequências de aminoácidos das grelhas para o anticorpo a ser humanizado podem ser comparadas com as das sequências de grelha humanas conhecidas, as sequências de grelha humanas a serem utilizadas para enxertia em CDR e seleccionadas com base nas suas sequências compreendendo elevada semelhança com as do anticorpo parental, *e.g.*, um anticorpo de murino que se liga a IL-17 (*e.g.*, um anticorpo compreendendo uma HCVR com

SEQ ID NO: 270 e além disso compreendendo uma LCVR com SEQ ID NO: 271). Foram isoladas numerosas sequências de grelha humanas e as suas sequências são relatadas na técnica. Isto aumenta a probabilidade de o anticorpo humanizado enxertado na CDR resultante, que contém CDRs do progenitor (e.g., murino) ou CDRs otimizadas do anticorpo parental enxertado em grelhas humanas seleccionadas (e possivelmente também a região constante humana) irá reter substancialmente a estrutura de ligação ao antigénio e desse modo reter a afinidade de ligação o anticorpo parental. Para reter num grau significativo da afinidade de ligação ao antigénio, as regiões de grelha humanas seleccionadas serão preferencialmente aquelas que se espera que sejam adequadas para administração *in vivo*, i.e., não imunogénica.

Em qualquer dos métodos, são obtidas as sequências de DNA que codificam as regiões de HCVR e LCVR do anticorpo anti-IL-17 preferencialmente de murino. São conhecidos na técnica métodos para clonar sequências de ácido nucleico que codificam imunoglobulinas. Esses métodos podem, por exemplo, envolver a amplificação das sequências que codificam a imunoglobulina a serem clonadas utilizando iniciadores apropriados, através da reacção em cadeia pela polimerase (PCR). Foram relatados na literatura iniciadores adequados para amplificar sequências de ácido nucleico de imunoglobulina, e especificamente sequências de HCVR e de LCVR de murino. Após essas sequências que codificam a imunoglobulina terem sido clonadas, elas serão sequenciadas através de métodos bem conhecidos na técnica.

Após as sequências que codificam a CDR serem enxertadas nas sequências que codificam a grelha humana seleccionada, as sequências de DNA resultantes que codificam as sequências variável pesada e variável leve "humanizadas" são então expressas para produzir um anticorpo humanizado ou Fv humanizado que se liga a IL-17. As HCVR e LCVR humanizadas podem ser expressas como parte de uma molécula de anticorpo anti-IL-17 total, *i.e.*, como uma proteína de fusão com sequências de domínio humano constante cujas sequências de DNA codificantes foram obtidas a partir de uma biblioteca comercialmente disponível ou que foram obtidas utilizando, *e.g.*, um dos métodos descritos acima para obter sequências de DNA, ou estão na técnica. Contudo, as sequências de HCVR e LCVR podem também ser expressas na ausência de sequências constantes para produzir um Fv anti-IL-17 humanizado. Contudo, a fusão de sequências constantes humanas com a região variável é potencialmente desejável porque o anticorpo humanizado anti-IL-17 resultante pode possuir funções de efector humano.

Métodos para sintetizar DNA que codifica uma proteína de sequência conhecida são bem conhecidos na técnica. Utilizando esses métodos, as sequências de DNA que codificam as sequências de HCVR e LCVR humanizadas do sujeito (com ou sem regiões constantes) são sintetizadas, e depois expressadas num sistema de vector adequado para expressão de anticorpos recombinantes. Isto pode ser

efectuado em qualquer sistema de vector que proporciona as sequências humanizados de HCVR e LCVR do sujeito a serem expressas como uma proteína de fusão com sequências de domínio constante humano e para associar para produzir anticorpos funcionais (ligação ao antigénio) ou fragmentos de anticorpo.

São conhecidas na técnica sequências do domínio constante humano, e foram relatadas na literatura. Sequências de cadeia leve humana constante preferidas incluem as sequências de cadeia leve constante kapa e lambda. Sequências de cadeia pesada constante humana preferidas incluem IgG<sub>1</sub> humana, IgG<sub>2</sub> humana, IgG<sub>3</sub> humana, IgG<sub>4</sub> humana (ver, e.g., Seq ID NOs: 257-260 respectivamente) e versões mutadas destas que proporcionam função efectora alterada, e.g., aumento da semi-vida *in vivo*, ligação ao receptor de Fc reduzida, perfil de desamidação alterado e semelhantes.

Se estiverem presentes, as regiões de grelha humanas são preferencialmente derivadas a partir de uma região variável do anticorpo humano possuindo uma semelhança de sequência com a região análoga ou equivalente do dador da região de ligação ao antigénio (*i.e.*, o anticorpo parental). Outras fontes de regiões de grelha para porções de origem humana de um anticorpo humanizado incluem sequências de consenso humanas variáveis (ver e.g., Kettleborough, CA. *et al.* *Protein Engineering* 4:773-783 (1991); Carter *et al.*, WO 94/04679. Por exemplo, a sequência do anticorpo ou região variável utilizada para obter a uma

porção não humana pode ser comparada a sequências humanas como descrito em Kabat et al. *Sequences of proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, NIH, U.S. Government Printing Office (1991). Numa forma de realização particularmente preferida, as regiões de grelha de uma cadeia de anticorpo humanizado são derivadas de uma região variável humana possuindo pelo menos cerca de 60% de identidade de sequência global, preferencialmente pelo menos cerca de 70%, 80%, ou 90% de identidade de sequência global e mais preferencialmente pelo menos cerca de 85% de identidade de sequência global, com a região variável do dador não humano. Um porção humana também pode ser derivada de um anticorpo humano possuindo pelo menos cerca de 65% de identidade de sequência, e preferencialmente pelo menos cerca de 70% de identidade de sequência, na porção particular (e.g., FR) a ser utilizada, quando comparada com a porção equivalente (e.g., FR) do dador não humano.

Referências que também descrevem métodos envolvidos na humanização de um anticorpo de murganho que podem ser utilizados são e.g., Queen et al, *Proc. Natl Acad. Sci USA* 88:2869, 1991; Pat. U.S. No. 5 693 761; Pat. U.S. No. 4 816 397; Pat. U.S. No. 5 225 539; programas de computador ABMOD e ENCAD como descrito em Levitt, M., *J. Mol. Biol.* 168:595-620, 1983; a humanização pode ser realizada essencialmente seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321:522-525, 1986; Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327, 1988; Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536, 1988).

Anticorpos Humanos

Como uma alternativa à humanização, podem ser gerados anticorpos humanos. Os anticorpos humanos podem ser produzidos utilizando várias técnicas conhecidas na técnica, incluindo bibliotecas de apresentação em fagos (Hoogenboom e Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381, 1991; Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581, 1991). As técnicas de Cole *et al.* e Boerner *et al.* estão também disponíveis para a preparação de anticorpos humanos monoclonais (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) e Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147:86-95, 1991). De um modo semelhante, podem ser produzidos anticorpos humanos introduzindo loci de imunoglobulina humana em animais transgênicos, *e.g.*, murganhos nos quais os genes de imunoglobulina endógena foram parcialmente ou completamente inactivados. Após imunização, *e.g.*, com um antigénio compreendendo um epitopo imunogénico da invenção, é obtido um reportório completo da produção de anticorpo humano, que se parece bastante com o que se observa em humanos em todos os aspectos, incluindo rearranjo de genes, montagem e reportório de anticorpo. Esta abordagem é descrita, por exemplo, nas Pat. U.S. Nos. 5 545 807; 5 545 806; 5 569 825; 5 589 369; 5 591 669; 5 625 126; 5 633 425; 5 661 016, e nas seguintes publicações científicas: Marks *et al.*, *BioTechnology* 10:779-783, 1992; Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859, 1994; Morrison, *Nature* 368: 812-13, 1994; Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14:845-51,

1996; Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); Lonberg e Huszar, *Intern. Rev. Immunol* 13: 65-93 (1995) e Jobkobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90:2551, 1993.

Genes de imunoglobulina humana introduzidos no murganho, criando desse modo murganhos transgênicos capazes de responder aos antigénios com anticorpos que possuem sequências humanas são também descritos em Bruggemann *et al.* (*Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86:6709-6713, 1989). Há várias estratégias que existem para a criação de mamíferos que produzem anticorpos humanos. Em particular, existe a abordagem de "minilocus" na qual um locus de Ig exógeno é mimetizado através da inclusão de pedaços (*e.g.*, genes individuais) do locus de Ig (ver, *e.g.*, Pat. U.S. Nos. 5 545 807, 5 545 806, 5 625 825, 5 625 126, 5 633 425, 5 661 016, 5 770 429, 5 789 650, e 5 814 318, 5 612 205, 5 721 367, 5 789 215), introdução de YAC de fragmentos grandes e substancialmente da linha germinal dos loci de Ig (ver Mendez *et al.* *Nature Genetics* 15:146-156, 1997; Green e Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495, 1998), e introdução dos loci inteiros ou substancialmente inteiros através da utilização de fusão de microcélulas (ver Pedido de Patente Europeia No. EP 0 843 961 A1).

Qualquer murganho transgênico capaz de responder à imunização com anticorpos que possuem sequências humanas pode ser utilizado para produzir um anticorpo anti-IL-17 da invenção quando se utilizam métodos disponíveis para i,

especialista na técnica, e.g., quando esse murganho é imunizado com um polipéptido compreendendo um epitopo imunogénico da invenção.

#### Utilizações

Os anticorpos da presente invenção são úteis em aplicações terapêuticas, profilácticas, de diagnóstico e de investigação como aqui descrito. Pode ser utilizado um anticorpo da invenção para diagnosticar um distúrbio ou doença associados com a expressão de IL-17 humana. De um modo semelhante, o anticorpo da invenção pode ser utilizado num ensaio para monitorizar os níveis de IL-17 num indivíduo a ser testado para um estado associado a IL-17. Aplicações de investigação incluem métodos que utilizam o anticorpo da invenção e um marcador para detectar IL-17 numa amostra, e.g., num fluido corporal humano ou num extracto de células ou de tecido. Os anticorpos da invenção podem ser utilizados com ou sem modificação, e são marcados através de ligação covalente ou não-covalente de uma unidade detectável. A unidade detectável pode ser qualquer uma que seja capaz de produzir, seja directamente ou indirectamente, um sinal detectável. Por exemplo, a unidade detectável pode ser um radioisótopo tal como, e.g.,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , ou  $^{125}\text{I}$ , um composto fluorescente ou quimioluminescente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ou luciferina; ou uma enzima, tal como fosfatase alcalina, beta-galactosidase, ou peroxidase de rábano. Pode ser empregue qualquer método conhecido na técnica para conjugar

separadamente o anticorpo com a unidade detectável, incluindo os métodos descritos por Hunter, *et al.*, *Nature* 144:945, 1962; David, *et al.*, *Biochemistry* 13: 1014, 1974; Pain, *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 40: 219, 1981; and Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30: 407, 1982. São conhecidos na técnica vários protocolos convencionais para medir IL-17, incluindo *e.g.*, ELISAs, RIAs, e FACS, e proporcionam uma base para diagnosticar níveis alterados ou anormais de expressão de IL-17. Os valores de expressão normais ou convencionais são estabelecidos utilizando qualquer técnica conhecida na técnica, *e.g.*, através da combinação de uma amostra compreendendo um polipéptido de IL-17 com, *e.g.*, anticorpos em condições adequadas para formar um complexo antigénio:anticorpo. O anticorpo é marcado directamente ou indirectamente com uma substância detectável para facilitar a detecção do anticorpo ligado ou não ligado. As substâncias detectáveis adequadas incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes e materiais radioactivos. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano, fosfatase alcalina,  $\beta$ -galactosidase, ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; e exemplos de um material radioactivo inclui  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ , ou  $^3\text{H}$ . (ver, *e.g.*, Zola, *Monoclonal Antibodies: A*

Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987)). A quantidade de um complexo convencional formado é quantificada através de vários métodos, tais como, *e.g.*, meios fotométricos. As quantidades de polipéptido IL-17 expresso nas amostras são então comparadas com os valores convencionais.

Por uma questão de conveniência, o anticorpo da presente invenção pode ser fornecido num estojo ("kit"), uma combinação embalada de reagentes em quantidades pré-determinadas com instruções para realizar o ensaio de diagnóstico. Quando o anticorpo é marcado com uma enzima, o estojo ("kit") irá incluir substratos e cofactores requeridos pela enzima (*e.g.*, um substrato precursor que proporciona o cromóforo ou fluoróforo detectável). Adicionalmente, podem ser incluídos outros aditivos tais como estabilizadores, tampões (*e.g.*, um tampão bloqueador ou tampão de lise) e semelhantes. As quantidades relativas dos vários reagentes podem ser largamente variadas para proporcionar as concentrações na solução dos reagentes que otimizam substancialmente a sensibilidade do ensaio. Particularmente, os reagentes podem ser fornecidos como pós secos, normalmente liofilizados, incluindo excipientes que, em dissolução, irão proporcionar uma solução de reagente possuindo a concentração apropriada.

#### Utilizações Terapêuticas para o Anticorpo

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória secretada por células T activadas nos sítios da inflamação, não na

circulação sistémica; não é rapidamente detectável no soro ou nos tecidos de uma pessoa saudável. A IL-17 regula positivamente as moléculas de adesão, induz a produção de citocinas inflamatórias múltiplas e quimiocinas de vários tipos de células incluindo sinoviócitos, condrócitos, fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais, induzindo desse modo o recrutamento de neutrófilos para um sítio inflamatório, estimula a produção de prostaglandinas e metaloproteinases, e inibe a síntese de proteoglicano. Para além disso, a IL-17 desempenha um papel importante na maturação das células hematopoiéticas progenitoras. A IL-17 possui papéis de sinalização em diferentes órgãos e tecidos incluindo pulmão, cartilagem articular, osso, cérebro, células hematopoiéticas, rim, pele e intestino. A IL-17 partilha uma homologia de 15-27% de aminoácidos com IL-17 B, C e E e 44-50% de homologia de aminoácidos com IL-17 D e F. A IL-17 liga-se ao receptor de IL-17 com baixa afinidade (cerca de 1 nM), enquanto outros membros da família IL-17 não se ligam ao receptor de IL-17.

Os níveis aumentados da IL-17 (*i.e.*, IL-17A) foram associados com vários estados incluindo inflamação das vias respiratórias, RA, osteoartrite, erosão óssea, abscessos e adesões intraperitoneais, IBD, rejeição de aloenxertos, psoríase, certos tipos de cancro, angiogénese, aterosclerose e MS. Ambos IL-17 e IL-17R são regulados positivamente no tecido sinovial de doentes de RA. A IL-17 exerce o seu papel na patogénese de RA através de vias dependentes e independentes de IL-1- $\beta$  e TNF- $\alpha$ . A IL-17

estimula a secreção de outras citocinas e quimiocinas, e.g., TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e Gro- $\alpha$ . A IL-17 contribui directamente para a progressão da doença em RA. A injeção da IL-17 no joelho de murganhos promove a destruição da articulação independentemente da actividade de IL-1 $\beta$  (*Ann. Rheum. Dis.* 59:529-32, 2000). O anticorpo anti-IL-1 $\beta$  não tem efeito na inflamação induzida por IL-17 e lesão das articulações (*J. Immunol.* 167:1004-1013, 2001). Num modelo de artrite induzido por SCW, a IL-17 induziu infiltração de célula inflamatória e eliminação de proteoglicano em murganhos silvestres e de desactivação de IL-1 $\beta$  e desactivação de TNF- $\alpha$ . Os murganhos com IL-17 desactivado são fenotipicamente normais na ausência de exposição antigénica, mas possuem artrite marcadamente reduzida seguindo a imunização com colagénio de tipo II (*J. Immunol.* 171:6173-6177, 2003).

A esclerose múltipla ("MS") é uma doença auto-imune caracterizada pela inflamação do sistema nervoso central ("CNS") com lesão para a folha de mielina que rodeia os axónios. Uma marca de MS é que as células T se infiltram no SNC. A MS afecta mais de 350 000 pessoas nos E.U.A. e 2,5 milhões de pessoas em todo o mundo. Existem muitas formas e a mais comum é a recaída/ressurgimento da doença ("RRMS) seguido por um estágio progressivo secundário. As terapêuticas actuais consistem em Interferão- $\beta$  (AVONEX, BETASERON e REBIF) que reduz a recaída/taxa de exacerbação por 31%-34%, mas pode produzir sintomas tipo gripe e/ou a síntese de anticorpos neutralizantes (e.g.,

cerca de 15% dos doentes que receberam AVONEX produzem anticorpos neutralizantes durante 18 meses. TYSABRI, aprovado pela FDA para RRMS foi subsequentemente retirado do mercado devido a preocupações relacionadas com a imunossupressão do SNC. Existe ainda uma necessidade médica não satisfeita no tratamento de MS. O mRNA de IL-17 é aumentado nas lesões de MS e em células mononucleares (MNC) no sangue e no líquido cefalorraquidiano de doentes com MS. São detectados números de MNC do sangue que expressam mRNA de IL-17 durante a exacerbação clínica de MS em comparação com a remissão (*Multiple Sclerosis*, 5:101-104, 1999). Para além disso, a encefalomielite auto-imunitária experimental ("EAE"), um modelo animal pré-clínico para MS é significativamente suprimido em murganhos desactivados para IL-17.

Por isso, uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da invenção pode ser útil para o tratamento ou prevenção de estados em que a presença de IL-17 provoca ou contribui para efeitos patológicos indesejáveis ou a diminuição da actividade de IL-17 possui um efeito terapêutico em mamíferos, preferencialmente humanos, incluindo, mas não limitado a, inflamação das vias aéreas, asma, RA, osteoartrite, erosão óssea, abscessos e adesões intraperitoniais, IBD, rejeição de aloenxerto, psoríase, certos tipos de cancro, angiogénese, aterosclerose e MS, assim como outros distúrbios inflamatórios, condições, doenças ou estados incluindo sem limite: resposta eritematosa, resposta à exposição a alergénios, *Helicobacter pylori* associada a gastrite, asma brônquica, e

rejeição de aloenxerto (e.g., renal), lúpus eritematoso sistémico e lupus nefrite. A utilização de um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da presente invenção para o tratamento ou prevenção de pelo menos um dos distúrbios acima mencionados em que a actividade de IL-17 é lesiva ou benéfica para níveis diminuídos de IL-17 bioactiva está aqui contemplada. Adicionalmente, a utilização de um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da presente invenção para utilização no fabrico de um medicamento para o tratamento de pelo menos um dos distúrbios acima mencionados está contemplado.

Como aqui utilizado, os termos "tratamento", "tratando", e semelhantes, referem-se à obtenção de um efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado. O efeito pode ser profiláctico em termos de prevenir completamente ou parcialmente uma doença ou sintoma desta e/ou pode ser terapêutica em termos de uma cura parcial ou completa para uma doença e/ou efeito adverso atribuível à doença. "Tratamento", como aqui utilizado, inclui a administração de um composto da presente invenção para o tratamento de uma doença ou estado num mamífero, particularmente num humano, e inclui: (a) prevenção da doença de ocorrer num indivíduo que pode estar predisposto à doença mas ainda não foi diagnosticado como possuindo essa doença; (b) inibir a doença, *i.e.*, parar o seu desenvolvimento; e (c) aliviar a doença, *i.e.*, provocar a regressão da doença ou distúrbio ou aliviar os seus sintomas ou complicações. Os regimes de dosagem podem ser ajustados para proporcionar a resposta

ótima desejada (e.g., a resposta terapêutica ou profilática). Por exemplo, pode ser administrado um único bólus, podem ser administradas várias doses divididas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica.

#### Composição farmacêutica

Um anticorpo da invenção pode ser incorporado em composições farmacêuticas adequadas para a administração a um indivíduo (ver, e.g., Exemplo 14). Os compostos da invenção podem ser administrados isoladamente ou em combinação com um veículo, diluente, e/ou excipiente farmacêuticamente aceitável, em doses únicas ou múltiplas. As composições farmacêuticas para administração são concebidas para serem apropriadas para o modo seleccionado de administração, e diluente, veículo, e/ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis, tais como agentes de dispersão, tampões, tensoactivos, conservantes, agentes de solubilização, agentes de isotonicidade, agentes estabilizadores e semelhantes são utilizados como apropriado (ver, e.g., Exemplo 14 aqui referido). As referidas composições são concebidas de acordo com técnicas convencionais como em e.g., Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19<sup>th</sup> Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1995 que proporciona um compêndio de técnicas de formulação como são geralmente conhecidas dos técnicos.

Uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo monoclonal anti-IL-17 da presente invenção pode ser administrada a um indivíduo em risco de, ou apresentando patologias como aqui descrito utilizando técnicas de administração convencional incluindo administração oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, pulmonar, transdérmica, intramuscular, intranasal, bucal, sublingual, ou em supositório.

A composição farmacêutica da invenção é preferencialmente uma "quantidade terapêuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilaticamente eficaz" de um anticorpo da invenção. Uma "quantidade terapêuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, a dosagens e durante períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado terapêutico desejado.

Uma quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo pode variar de acordo com factores tais como o estado da doença, idade, sexo, e peso do indivíduo, e a capacidade do anticorpo ou porção de anticorpo para induzir uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapêuticamente eficaz é também uma na qual qualquer efeito tóxico ou lesivo do anticorpo, é compensado pelos efeitos terapêuticamente benéficos. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, a dosagens e durante períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado profilático desejado. Tipicamente, uma vez que é utilizada uma dose profiláctica em indivíduos

antes de ou num estado precoce da doença, a quantidade profilacticamente eficaz será inferior à quantidade terapêuticamente eficaz.

Uma quantidade terapêuticamente eficaz ou profilacticamente eficaz é pelo menos a dose mínima, mas inferior a uma dose tóxica, de um agente activo que é necessário para provocar um benefício terapêutico a um indivíduo. Dito de outro modo, uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo da invenção é uma quantidade que em mamíferos, preferencialmente humanos, diminui uma bioactividade de IL-17, *e.g.*, ligação a IL17R, em que a presença de IL-17 provoca ou contribui para efeitos patológicos indesejáveis ou a diminuição nos níveis de IL-17 resultam num efeito terapêutico benéfico num mamífero, preferencialmente um humano.

A via de administração de um anticorpo da presente invenção pode ser oral, parentérica, por inalação, ou tópica. Preferencialmente, os anticorpos da invenção podem ser incorporados numa composição farmacêutica adequada para administração parentérica. O termo parentérico, como aqui utilizado, inclui administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, rectal, vaginal, ou intraperitoneal. A distribuição sistémica periférica através de injeção intravenosa ou intraperitoneal ou subcutânea é preferida. Veículos adequados para essas injeções são simples na técnica.

A composição farmacêutica deve ser tipicamente estéril e estável nas condições de fabrico e armazenamento no recipiente proporcionado, incluindo *e.g.*, um frasco selado ou seringa. Por isso, as composições farmacêuticas podem ser esterilizadas por filtração após preparar a formulação, ou tornada, de outro modo microbiologicamente aceitável. Uma composição típica para a infusão intravenosa pode possuir um volume tão elevado como 250-1000 mL de fluido, tal como solução de Ringer estéril, soro fisiológico, solução de dextrose e solução de Hank e uma dose terapêuticamente eficaz, (*e.g.*, 1 até 100 mg/mL, ou mais) de concentração de anticorpo. A Dose pode variar dependendo do tipo e gravidade da doença. Como é bem conhecido nas artes médicas, as dosagens para qualquer sujeito depende de muitos factores, incluindo o tamanho do doente, área de superfície corporal, idade, o composto particular a ser administrado, sexo, tempo e via de administração, saúde geral, e outros fármacos que são administrados presentemente. Uma dose típica pode ser, por exemplo, no intervalo de 0,001 até 1000 µg; contudo, doses abaixo ou acima deste intervalo exemplar são pensados, considerando especialmente os factores acima mencionados. O regime de dosagem parentérica diário pode ser cerca de 0,1 µg/kg até cerca de 100 mg/kg do peso corporal total, preferencialmente desde cerca de 0,3 µg/kg até cerca de 10 mg/kg e mais preferencialmente desde cerca de 1 µg/kg até 1 mg/kg, ainda mais preferencialmente desde cerca de 0,5 até 10 mg/kg de peso corporal por dia. O progresso pode ser monitorizado por avaliação periódica. Para administrações repetidas ao longo de vários dias ou mais prolongadas, dependendo do

estado, o tratamento é repetido até ocorrer uma supressão desejada dos sintomas da doença. Todavia, podem ser úteis outros regimes de dosagem e não são aqui excluídos. A dosagem desejada pode ser distribuída por uma administração de bólus único, através de múltiplas administrações de bólus, ou por administração de infusão contínua do anticorpo, dependendo do padrão da quebra farmacocinética que o técnico deseja alcançar.

Estas quantidades sugeridas de anticorpo estão sujeitas a uma grande quantidade de descrição terapêutica. O factor chave na selecção de uma dose apropriada e calendarização é o resultado obtido. Os factores para consideração neste contexto incluem o distúrbio particular a ser tratado, o mamífero particular a ser tratado, o estado clínico do doente individual, a causa do distúrbio, o sítio de distribuição do anticorpo, o tipo particular do anticorpo, o método de administração, o calendário da administração, e outros factores conhecidos dos técnicos de saúde.

Os agentes terapêuticos da invenção podem ser congelados ou liofilizados para armazenamento e reconstituídos num transportador estéril adequado antes da utilização. A liofilização e reconstituição podem conduzir a graus variáveis de perda de actividade do anticorpo. As dosagens podem ter de ser ajustadas para compensar. Geralmente, é preferido o pH entre 6 e 8.

Artigo de Fabrico.

Noutra forma de realização da invenção, um artigo de fabrico contendo materiais úteis para o tratamento ou prevenção dos distúrbios ou estados descritos acima é proporcionado. O artigo de fabrico compreende um recipiente e um marcador. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas, e tubos de ensaio. Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais, tais como vidro ou plástico. O recipiente armazena uma composição de um anticorpo da invenção que é eficaz para prevenir ou tratar o distúrbio ou estado e pode possuir uma porta de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser um saco de solução intravenosa ou um frasco possuindo uma rolha que se pode furar com uma agulha de injeção hipodérmica). O agente activo na composição é um anticorpo anti-IL-17 da invenção. O marcador em, ou associado ao, recipiente indica que a composição é utilizada para tratar a condição de escolha. O artigo do fabrico pode compreender além disso um segundo recipiente compreendendo um tampão farmacologicamente aceitável, tal como uma solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Pode além disso incluir outros materiais desejáveis de um posto de vista comercial e do utilizador, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas, e inserções na embalagem com instruções para utilização. Os seguintes exemplos são oferecidos apenas para objectivos de ilustração, e não pretendem limitar o âmbito da presente invenção, de forma alguma.

TABELA 1 NÚMEROS DE SEQ ID

Fab #	LCVR	CDR1 leve	CDR2 leve	CDR3 leve	HCVR	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
1	178	122	150	168	56	11	29	33
2	179	122	150	169	57	11	29	34
3	180	123	150	168	56	11	29	33
4	181	124	150	168	58	11	29	35
5	179	122	150	169	59	11	29	36
6	182	124	150	169	60	11	29	37
7	183	125	150	170	56	11	29	33
8	184	124	150	171	61	11	29	38
9	185	124	150	170	62	11	29	39
10	178	122	150	168	60	11	29	37
11	181	124	150	168	61	11	29	38
12	186	124	150	172	63	11	29	40
13	187	123	150	169	64	11	29	41
14	188	123	150	173	65	11	29	42
15	189	124	150	174	66	11	29	43
16	181	124	150	168	62	11	29	39
17	187	123	150	169	61	11	29	38
18	181	124	150	168	67	11	29	44
19	190	124	150	175	56	11	29	33
20	178	122	150	168	68	12	29	33
21	178	122	150	168	69	13	29	33
22	178	122	150	168	70	14	29	33
23	178	122	150	168	71	15	29	33
24	178	122	150	168	72	16	29	33

(continuação)

Fab #	LCVR	CDR1 leve	CDR2 leve	CDR3 leve	HCVR	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
25	178	122	150	168	73	17	29	33
26	178	122	150	168	74	18	29	33
27	178	122	150	168	75	19	29	33
28	178	122	150	168	76	20	29	33
29	178	122	150	168	77	21	29	33
30	178	122	150	168	78	22	29	33
31	178	122	150	168	79	23	29	33
32	178	122	150	168	80	24	29	33
33	178	122	150	168	81	11	30	33
34	178	122	150	168	82	11	31	33
35	178	122	150	168	83	11	32	33
36	178	122	150	168	58	11	29	35
37	178	122	150	168	84	11	29	45
38	178	122	150	168	85	11	29	261
39	178	122	150	168	86	11	29	47
40	178	122	150	168	87	11	29	48
41	178	122	150	168	88	11	29	49
42	178	122	150	168	89	11	29	50
43	178	122	150	168	90	11	29	51
44	178	122	150	168	91	11	29	52
45	178	122	150	168	92	11	29	53
46	178	122	150	168	93	11	29	54
47	191	125	150	168	56	11	29	33
48	192	126	150	168	56	11	29	33
49	193	127	150	168	56	11	29	33

(continuação)

Fab #	LCVR	CDR1 leve	CDR2 leve	CDR3 leve	HCVR	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
50	194	128	150	168	56	11	29	33
51	195	129	150	168	56	11	29	33
52	196	130	150	168	56	11	29	33
53	197	131	150	168	56	11	29	33
54	198	132	150	168	56	11	29	33
55	199	133	150	168	56	11	29	33
56	200	134	150	168	56	11	29	33
57	201	135	150	168	56	11	29	33
58	202	136	150	168	56	11	29	33
59	203	137	150	168	56	11	29	33
60	204	138	150	168	56	11	29	33
61	205	139	150	168	56	11	29	33
62	206	140	150	168	56	11	29	33
63	199	133	150	168	56	11	29	33
64	207	141	150	168	56	11	29	33
65	208	142	150	168	56	11	29	33
66	209	143	150	168	56	11	29	33
67	210	144	150	168	56	11	29	33
68	211	122	151	168	56	11	29	33
69	212	122	150	176	56	11	29	33
70	213	122	150	177	56	11	29	33
71	214	145	150	168	94	25	29	46
72	191	125	150	168	95	26	29	46
73	215	146	150	168	96	26	29	55
74	199	133	150	168	97	26	29	48

(continuação)

Fab #	LCVR	CDR1 leve	CDR2 leve	CDR3 leve	HCVR	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
75	178	122	150	168	95	26	29	46
76	199	133	150	168	95	26	29	46
78	178	122	150	168	98	26	29	47
79	195	129	150	168	99	27	29	46
80	195	129	150	168	97	26	29	48
82	199	133	150	168	98	26	29	47
84	199	133	150	168	100	26	29	52
85	191	125	150	168	98	26	29	47
86	191	125	150	168	95	26	29	46
87	216	147	150	168	95	26	29	46
88	199	133	150	168	94	25	29	46
89	196	130	150	168	100	26	29	52
91	195	129	150	168	97	26	29	48
92	216	147	150	168	97	26	29	48
93	195	129	150	168	101	27	29	48
94	199	133	150	168	95	26	29	46
95	217	130	152	168	98	26	29	47
96	218	125	153	168	102	26	32	46
97	219	145	154	168	97	26	29	48
98	199	133	150	168	98	26	29	47
99	199	133	150	168	95	26	29	46
100	220	125	155	168	103	26	32	33
101	221	133	156	168	95	26	29	46
102	222	148	157	168	95	26	29	46
103	223	130	158	168	104	26	32	46

(continuação)

Fab #	LCVR	CDR1 leve	CDR2 leve	CDR3 leve	HCVR	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3
104	224	145	159	168	104	26	32	46
105	225	130	150	169	105	26	32	47
106	226	133	160	168	106	26	29	47
107	227	130	161	169	107	25	32	48
108	228	133	162	169	108	25	29	47
109	229	130	163	168	109	27	32	46
110	230	131	164	169	100	26	29	52
111	231	146	165	168	95	26	29	46
112	232	125	166	168	97	26	29	48
113	199	133	150	168	110	27	29	47
114	233	129	159	168	106	26	29	47
115	234	133	167	168	106	26	29	47
116	235	149	167	168	110	27	29	47
117	236	125	167	168	111	28	32	53
118	234	133	167	168	112	26	30	53
119	237	122	167	168	100	26	29	52
120	238	122	167	169	112	28	30	46
121	239	147	167	169	113	28	32	46
122	237	122	167	168	114	26	30	53
123	236	125	167	168	115	26	29	53
124	240	131	167	168	116	11	30	53
125	178	122	150	168	117	26	32	52
126	241	131	167	168	118	26	30	52
127	241	131	167	168	106	26	29	47
128	242	129	167	169	119	27	30	47

129	236	125	167	168	120	26	30	52
130	243	129	167	168	119	27	30	47
131	236	125	167	168	117	26	32	52
132	236	125	167	168	121	27	30	52

Tabela 2 Alinhamentos de CDR de cadeia pesada

Fab#	CDR1	SEQ ID No.	CDR2	SEQ ID No.	CDR3	SEQ ID No.
1	<u>GYSFTDYNMN</u>	11	<u>VINPNYGTTDYNQRFKG</u>	29	<u>YDYATGTGAY</u>	33
2	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYWTGTGGY	34
3	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
4	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYWTGTGAY	35
5	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGLY	36
6	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGGY	37
7	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
8	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGVY	38
9	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYHTGTGGY	39
10	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGGY	37
11	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGVY	38
12	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGTY	40
13	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYFTGTGGY	41
14	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYFTGTGPY	42
15	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYTTGTGGY	43
16	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYHTGTGGY	39
17	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGVY	38
18	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYSTGTGGY	44
19	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
20	GYSFTDYNIN	12	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
21	GYSFTDYNLN	13	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
22	GYSFGDYNMN	14	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
23	GYSFRDYNMN	15	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
24	GYSFTWYNMN	16	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
25	GYSFNDYNMN	17	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
26	GYSFTDYNMS	18	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33

(continuação)

Fab#	SEQ ID		SEQ ID		SEQ ID	
	CDR1	No.	CDR2	No.		CDR3
27	GYSFTDYN <u>T</u> N	19	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
28	GYSFPDYNMN	20	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
29	<u>H</u> YSFTDYNMN	21	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
30	G <u>Y</u> HFTDYNMN	22	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
31	G <u>P</u> FTDYNMN	23	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
32	GYSFTD <u>F</u> NMN	24	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
33	GYSFTDYNMN	11	VINP <u>M</u> YGTTDYNQRFGK	30	YDYATGTGAY	33
34	GYSFTDYNMN	11	VINP <u>A</u> YGTTDYNQRFGK	31	YDYATGTGAY	33
35	GYSFTDYNMN	11	VINP <u>E</u> YGTTDYNQRFGK	32	YDYATGTGAY	33
36	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YD <u>Y</u> WTGTGAY	35
37	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YD <u>Y</u> STGTGAY	45
38	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YD <u>A</u> FTGTGAY	261
39	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YD <u>Y</u> YTGTGAY	47
40	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YD <u>Y</u> HTGTGAY	48
41	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YD <u>Y</u> LTGTGAY	49
42	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYAT <u>S</u> TGAY	50
43	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYAP <u>G</u> TGAY	51
44	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YD <u>Y</u> FTGTG <u>V</u> Y	52
45	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YD <u>Y</u> YTGTG <u>V</u> Y	53
46	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YD <u>P</u> ATGTGAY	54
47	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
48	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
49	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
50	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
51	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
52	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
53	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
54	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
55	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
56	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
57	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
58	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33
59	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFGK	29	YDYATGTGAY	33

(continuação)

Fab#	SEQ ID		SEQ ID		SEQ ID	
	CDR1	No.	CDR2	No.		CDR3
60	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
61	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
62	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
63	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
64	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
65	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
66	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
67	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
68	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
69	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
70	GYSFTDYNMN	11	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDYATGTGAY	33
71	GYSFTDY <u>HLG</u>	25	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
72	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
73	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGT <u>GVY</u>	55
74	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
75	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
76	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
78	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
79	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
80	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
82	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
84	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGT <u>GVY</u>	52
85	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
86	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
87	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
88	GYSFTDY <u>HLG</u>	25	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
89	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGT <u>GVY</u>	52
91	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
92	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
93	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
94	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
95	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
96	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VIN <u>P</u> <u>E</u> YGTTDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGAY	46

(continuação)

Fab#	SEQ ID		SEQ ID		SEQ ID	
	CDR1	No.	CDR2	No.		CDR3
97	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
98	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
99	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
100	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPEYGTTDYNQRFKG	32	YDYATGTGAY	33
101	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
102	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
103	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPEYGTTDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
104	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPEYGTTDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
105	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPEYGTTDYNQRFKG	32	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
106	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
107	GYSFTDY <u>HLG</u>	25	VINPEYGTTDYNQRFKG	32	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
108	GYSFTDY <u>HLG</u>	25	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
109	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPEYGTTDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
110	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGVY	52
111	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
112	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>H</u> TGTGAY	48
113	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
114	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
115	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
116	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGVY	47
117	GYSFTDY <u>HIS</u>	28	VINPEYGTTDYNQRFKG	32	YDY <u>Y</u> TGTGY	53
118	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPMYGTTDYNQRFKG	30	YDY <u>Y</u> TGTGVY	53
119	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>F</u> TGTGVY	52
120	GYSFTDY <u>HIS</u>	28	VINPMYGTTDYNQRFKG	30	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
121	GYSFTDY <u>HIS</u>	28	VINPEYGTTDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGAY	46
122	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPMYGTTDYNQRFKG	30	YDY <u>Y</u> TGTGVY	53
123	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGVY	53
124	GYSFTDY <u>NMN</u>	11	VINPMYGTTDYNQRFKG	30	YDY <u>Y</u> TGTGVY	53
125	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPEYGTTDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGTGVY	52
126	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPMYGTTDYNQRFKG	30	YDY <u>F</u> TGTGVY	52
127	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPNYGTTDYNQRFKG	29	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
128	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VINPMYGTTDYNQRFKG	30	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
129	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VINPMYGTTDYNQRFKG	30	YDY <u>F</u> TGTGVY	52

(continuação)

Fab#	SEQ ID		SEQ ID		SEQ ID	
	CDR1	No.	CDR2	No.		CDR3
130	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VIN <u>P</u> MYGTTDYNQRFKG	30	YDY <u>Y</u> TGTGAY	47
131	GYSFTDY <u>HIH</u>	26	VIN <u>P</u> EYGTTDYNQRFKG	32	YDY <u>F</u> TGT <u>G</u> VY	52
132	GYSFTDY <u>HMS</u>	27	VIN <u>P</u> MYGTTDYNQRFKG	30	YDY <u>F</u> TGT <u>G</u> VY	52

Consenso:

SEQ ID NO: 244	SEQ ID NO: 245	SEQ ID NO: 246
X <sub>1</sub> YX <sub>3</sub> FX <sub>5</sub> X <sub>6</sub> X <sub>7</sub> X <sub>8</sub> X <sub>9</sub> X <sub>10</sub>	VINPX <sub>5</sub> YGTTDYNQRFKG	YDX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> TGX <sub>9</sub> Y
X <sub>1</sub> é H ou G	X <sub>5</sub> é N, A, M ou E	X <sub>3</sub> é Y, A ou P
X <sub>3</sub> é S, H ou P		X <sub>4</sub> é Y, F, H, S, W, L ou A
X <sub>5</sub> é G, R, T, N ou P		X <sub>5</sub> é T ou P
X <sub>6</sub> é D ou W		X <sub>6</sub> é G ou S
X <sub>7</sub> é Y ou F		X <sub>9</sub> é A, G, L, V, <u>P</u> ou T
X <sub>8</sub> é N ou H		
X <sub>9</sub> é M, T, L ou I		
X <sub>10</sub> é N, G, H ou S		

**Tabela 3 Alinhamentos de CDR de Cadeia leve Table 3 Light**

Fab#	CDR1	SEQ ID NO: CDR2	SEQ ID NO: CDR3	SEQ ID NO:		
1	<u>RSSQSLVHSRGNTYLH</u>	122	<u>KVSNRFS</u>	150	<u>SQSTHLPFT</u>	168
2	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHYPFT	169
3	RSSQSLVHSHGNTYLH	123	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
4	RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
5	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHYPFT	169
6	RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTH <u>Y</u> PFT	169
7	RSSQSLVHS <u>Y</u> GNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTH <u>I</u> PFT	170
8	RSSQSLVHS <u>S</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSL <u>L</u> HVPFT	171
9	RSSQSLVHS <u>N</u> GNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTH <u>I</u> PFT	170

(continuação)

Fab#	CDR1	SEQ ID NO:	CDR2	SEQ ID NO:	CDR3	SEQ ID NO:
10	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
11	RSSQSLVHS <u>N</u> NGNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
12	RSSQSLVHS <u>N</u> NGNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTH <u>E</u> PFFT	172
13	RSSQSLVHS <u>H</u> NGNTYLH	123	KVSNRFS	150	SQSTH <u>Y</u> PFFT	169
14	RSSQSLVHS <u>H</u> NGNTYLH	123	KVSNRFS	150	<u>N</u> QSTHVPFFT	173
15	RSSQSLVHS <u>N</u> NGNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQ <u>T</u> THVPFFT	174
16	RSSQSLVHS <u>N</u> NGNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
17	RSSQSLVHS <u>H</u> NGNTYLH	123	KVSNRFS	150	SQSTH <u>Y</u> PFFT	169
18	RSSQSLVHS <u>N</u> NGNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
19	RSSQSLVHS <u>N</u> NGNTYLH	124	KVSNRFS	150	SQSM <u>H</u> VPFFT	175
20	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
21	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
22	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
23	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
24	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
25	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
26	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
27	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
28	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
29	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
30	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
31	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
32	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
33	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
34	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
35	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
36	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
37	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
38	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
39	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
40	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
41	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
42	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
43	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168

(continuação)

Fab#	CDR1	SEQ ID NO:	CDR2	SEQ ID NO:	CDR3	SEQ ID NO:
44	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
45	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
46	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
47	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
48	RSSQSLV <u>V</u> HSRGNTYLH	126	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
49	<u>V</u> SSQSLVHSRGNTYLH	127	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
50	RSS <u>A</u> SLVHSRGNTYLH	128	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
51	RSSQSL <u>K</u> HSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
52	RSSQSL <u>R</u> HSRGNTYLH	130	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
53	RSSRSLVHSRGNTYLH	131	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
54	R <u>S</u> HQSLVHSRGNTYLH	132	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
55	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> LH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
56	RSSQSLV <u>H</u> NRGNTYLH	134	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
57	RSSQSLVHSR <u>G</u> TYLH	135	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
58	RSSQSLVH_ <u>R</u> RGNTYLH	136	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
59	RSSQSLVHSRGNTY <u>T</u> H	137	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
60	RSSQSLVHSRGNTY <u>S</u> H	138	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
61	RSSQSLVHSRGNTY <u>H</u> H	139	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
62	<b>R</b> SSQSLV <u>H</u> AARGNTYLH	140	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
63	RSSQSLVHSRGNTY <u>F</u> H	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
64	RSSQSLVHSRGNT <u>W</u> LH	141	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
65	RSSQSLVHSRGN <u>V</u> YLH	142	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
66	RSSQSLVHSR <u>G</u> KTYLR	143	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
67	RSSQSLV <u>H</u> L <sub>R</sub> RGNTYLH	144	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
68	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	167	SQSTHLPFFT	168
69	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQ <u>T</u> HLPFFT	176
70	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQST <u>S</u> L <sub>P</sub> FFT	177
71	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTFLH	145	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
72	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
73	RSSQSL <u>R</u> HSRGNT <u>F</u> LH	146	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
74	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> LH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
75	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
76	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> LH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
78	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
79	RSSQSL <u>K</u> HSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168
80	<b>R</b> SSQSL <u>K</u> HSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHLPFFT	168

(continuação)

Fab#	CDR1	SEQ ID NO:	CDR2	SEQ ID NO:	CDR3	SEQ ID NO:
82	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> FLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
84	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> FLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
85	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
86	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
87	RSSQSL <u>K</u> HSRGNT <u>F</u> FLH	147	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
88	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> FLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
89	RSSQSL <u>R</u> KSRGNTYLH	130	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
91	<u>R</u> SSQSLRHSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
92	<u>R</u> SSQSLKHSRGNT <u>F</u> FLH	147	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
93	RSSQSLKHSRGNTYLH	129	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
94	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> FLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
95	<u>R</u> SSQSL <u>R</u> HSGRGNTYLH	130	KVSNR <u>F</u> H	152	SQSTHLPFT	168
96	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KV <u>A</u> NRFS	153	SQSTHLPFT	168
97	RSS <u>K</u> SLVHSRGNT <u>F</u> FLH	145	KV <u>S</u> <u>V</u> RFS	154	SQSTHLPFT	168
98	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> FLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
99	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> FLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
100	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	155	SQSTHLPFT	168
101	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> FLH	133	KVDNRFS	156	SQSTHLPFT	168
102	RSS <u>R</u> SLVHSRGNT <u>F</u> FLH	148	KVSNRFS	157	SQSTHLPFT	168
103	RSSQSL_RHSRGNTYLH	130	KVSNRFS	158	SQSTHLPFT	168
104	RSS_KSLVHSRGNT_FLH	145	KVSNRFS	159	SQSTHLPFT	168
105	RSSQSL_RHSRGNTYLH	130	KVSNRFS	150	SQSTH_YPFT	169
106	RSSQSLVHSRGNT <u>F</u> FLH	133	KVSNRFS	160	SQSTHLPFT	168
107	RSSQSLR_HSRGNTYLH	130	KVSNRFS	161	SQSTH_YPFT	169
108	RSSQSLVHSRGNT_FLH	133	KVSNRFS	162	SQSTH_YPFT	169
109	RSSQSLRHSRGNTYLH	130	KVSNRFS	163	SQSTHLPFT	168
110	RSSRSLVHSRGNTYLH	131	KVSNR <u>F</u> <u>T</u>	164	SQSTH_YPFT	169
111	RSSQSLRHSRGNT_FLH	146	KVSNRFS	165	SQSTHLPFT	168
112	RSSRSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFS	166	SQSTHLPFT	168
113	RSSQSLVHSRGNT_FLH	133	KVSNRFS	150	SQSTHLPFT	168
114	RSSQSLKHSRGNTYLH	129	KVSNRFS	159	SQSTHLPFT	168
115	RSSQSLVHSRGNT_FLH	133	KVSNRFS	167	SQSTHLPFT	168
116	RSSQSLkfiSHGNTYLH	149	KVSNRFI	167	SQSTHLPFT	168
117	RSS <u>K</u> SLVHSRGNTYLH	125	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTHLPFT	168
118	RSSQSLVHSRGNT_FLH	133	KVSNRF <u>I</u>	167	SQSTHLPFT	168
119	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFI	167	SQSTHLPFT	168

(continuação)

Fab#	CDR1	SEQ ID NO: CDR2	SEQ ID NO: CDR3	SEQ ID NO:
120	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFI	167
121	RSSQSLKfiSRGNT_FLH	147	KVSNRFI	167
122	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFI	167
123	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFI	167
124	RSSRSLVHSRGNTYLH	131	KVSNRFI	167
125	RSSQSLVHSRGNTYLH	122	KVSNRFS	150
126	RSSRSLVHSRGNTYLH	131	KVSNRFS	167
127	RSSRSLVHSRGNTYLH	131	KVSNRFI	167
128	RSSQSLRHSRGNTYLH	129	KVSNRFI	167
129	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFI	167
130	RSSQSLKHSRGNTYLH	129	KVSNRFI	167
131	RSSR_SLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFI	167
132	RSSKSLVHSRGNTYLH	125	KVSNRFI	167

Consenso:

SEQ ID NO: 247	SEQ ID NO: 248	SEQ ID NO: 249
X <sub>1</sub> SX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> SX <sub>6</sub> X <sub>7</sub> HX <sub>9</sub> X <sub>10</sub> GX <sub>12</sub> X <sub>13</sub> X <sub>14</sub> X <sub>15</sub> H	X <sub>1</sub> VX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> RX <sub>6</sub> X <sub>7</sub>	X <sub>1</sub> QX <sub>3</sub> X <sub>4</sub> X <sub>5</sub> X <sub>6</sub> PFT
X <sub>1</sub> é R ou V	X <sub>13</sub> é K ou I	X <sub>1</sub> é S ou N
X <sub>3</sub> é S ou H	X <sub>3</sub> é S, A, D, T, R, H ou P	X <sub>3</sub> é S ou T
X <sub>4</sub> é Q, K, R ou A	X <sub>4</sub> é N, V ou T	X <sub>4</sub> é T, L ou M
X <sub>6</sub> é V ou L	X <sub>5</sub> é R, I ou N	x <sub>5</sub> é H ou S
X <sub>7</sub> é R, V ou K	X <sub>6</sub> é F, I ou N ou	X <sub>6</sub> é L, I, V, E ou Y
X <sub>9</sub> é S, N, R, A ou L	X <sub>7</sub> é S, H, I, T ou V	
X <sub>10</sub> é H,R,N ou Y		
X <sub>12</sub> é N, K ou R		
X <sub>13</sub> é T ou V		
X <sub>14</sub> é F, Y ou W		
X <sub>15</sub> é L, T, S, H ou F		

**EXEMPLOS**

Exemplo 1 ELISA I: Ligação do Anticorpo a IL-17 de Várias Espécies

Um ensaio de ELISA exemplar para medir a ligação dos anticorpos a IL-17 utiliza placas de microtitulação seladas Costar 3366 que são revestidas durante a noite a 4 °C com 50 µL de 1,0 µg/mL de IL-17 humana por poço (R&D Systems, #317-IL/CF) em tampão de revestimento de carbonato (carbonato de sódio a 50 mM, pH 9,0). Alternativamente, são utilizadas IL-17 de murganho, rato, coelho ou de macaco cinomólogo. É utilizada IL-22 humana (R&D Systems) como um antigénio de controlo. A IL-17 de coelho e de macaco cinomólogo não estão disponíveis comercialmente e por isso requer clonagem e expressão, ou síntese artificial, de acordo com métodos conhecidos na técnica utilizando as sequências de aminoácidos para IL-17 das várias espécies fornecidas na Figura 2 (Seq ID NOs: 9 e 10). Sequências de nucleótidos exemplares que codificam IL-17 das várias espécies são apresentadas nas SEQ ID NOs: 250-254.

A placa é bloqueada subsequentemente através da adição de 100 µL de tampão de bloqueamento (Pierce #37515). A placa é incubada durante 1 hora a 37 °C depois lavada três vezes em tampão de lavagem (PBS pH 7,4 e 0,05% Tween). Depois, é adicionado 50 µL de anticorpo da amostra ou anticorpo de controlo (diluída para várias concentrações em PBS a pH 7,4, e.g., 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032 e 0 µg/mL)

a cada poço e a placa é além disso incubada durante 1 hora a 37 °C. A placa é então lavada três vezes com tampão de lavagem antes de adicionar 50 µL por poço de fosfatase kapa-alcálica anti-humana conjugada diluída para 1:1000 em PBS pH 7,4. As amostras de teste são incubadas durante 1 hora a 37 °C. Depois é preparado de fresco p-nitrofenil fosfato em sal de dissódio (PNPP, Pierce #37620) dissolvendo em tampão de substrato de dietanolamina de acordo com as instruções do fabricante e é adicionado 50 µL a cada poço. O desenvolvimento de cor é deixado prosseguir durante cerca de 10 minutos à temperatura ambiente depois o sinal da cor é medido a uma absorvência de 405 nm utilizando qualquer leitor de placas de ELISA apropriada. O grau de ligação é proporcional à produção do sinal de cor.

Os anticorpos da invenção ligam-se a IL-17 humana num ensaio de ELISA como aqui descrito, mas não se liga a IL-17 de rato ou murganho. É antecipado, dados os resultados do Biacore de Exemplo 4 demonstrando que os anticorpos da invenção se ligam a IL-17 humana e de macaco, que os anticorpos da invenção também demonstrariam ligação a IL-17 de macaco num ensaio de ELISA como aqui descrito.

Exemplo 2 ELISA II: Ligação do Anticorpo a proteínas da família de IL-17

É utilizada uma ELISA para medir se os anticorpos da invenção se ligam selectivamente e/ou preferencialmente a membros particulares da IL-17 humana (e.g., IL-17A, IL-

17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E ou IL-17F) ou IL-22 humana (controle negativo).

Num ensaio exemplar, os poços da placa de ELISA (Nunc Immuno Maxisorp) são revestidos com 100 µL (0,5 µg/mL em tampão de revestimento a 1X (BioF<sub>x</sub>)) de proteínas dos membros da família da IL-17 (R&D Systems) seladas e incubadas durante a noite a 4 °C. A solução no poço é removida sacudindo e é adicionado agente de bloqueamento (200 µL 1,5% BSA em PBS). As placas são incubadas num agitador de rotação durante 30 minutos à temperatura ambiente. Depois, é adicionado 100 µL de um anticorpo a ser testado por poço a concentrações variáveis (e.g., 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032 e 0 µg/mL). As placas são novamente incubadas durante a noite (4 °C) seguido por aquecimento num agitador de rotação (60 min à temperatura ambiente). Cada placa-poço é então lavada cinco vezes com tampão (1X tampão Ish, BioF<sub>x</sub>). Após a lavagem, é adicionado um anticorpo secundário conjugado com HRP apropriado disponível comercialmente (1:2000 em PBS com 1,5% de BSA) (100 µL/poço). As placas são re-incubadas num agitador de rotação (60 min. temp. ambiente) seguido por lavagem com tampão (5X) como descrito acima. O sinal colorimétrico é desenvolvido adicionando TMB (100 µL/poço) até à saturação (aprox 3-5 min.) depois é terminado o desenvolvimento posterior adicionando solução de terminação (100 µL/poço, BioF<sub>x</sub>). O sinal de cor é medido a 450 nm de absorvência utilizando qualquer leitor de placas de ELISA apropriadas. O grau de ligação é proporcional à produção do sinal de

cor. Os anticorpos da invenção (e.g., Fabs 103, 104, 118, 121, 126 e 131 como descrito na Tabela 1) ligam-se especificamente a IL-17 humana (i.e., IL-17A), mas, em condições semelhantes, não se liga a níveis superiores aos de fundo a IL-17B humana, IL-17C humana, IL-17D humana, IL-17E humana, IL-17F humana, IL-17 de murino ou IL-22 humana.

Exemplo 3 Isolamento e activação de células para clonar IL-17

#### A. Esplenócitos de Rato

Utilizando fórceps e tesouras estéreis, remover o baço de um rato sacrificado por inalação de CO<sub>2</sub> e colocar o baço num tubo contendo 5 mL de meio RPMI 1640 media + 10% de soro de bovino fetal e penicilina/estreptomicina (solução do meio). Verter os conteúdos do tubo para uma placa de Petri de 10 cm e remover a gordura do baço. Homogeneizar o baço suavemente utilizando um par de lâminas de microscópio pré-autoclavadas totalmente foscas. Remover as células das lâminas por lavagem utilizando a solução do meio, pipetar algumas vezes e filtra as células através de uma peneira celular (Fisher Scientific). Lavar as células uma vez com solução do meio, contar as células e ressuspendê-las para uma concentração final de  $2 \times 10^7$  células/mL em 80 mL. Adicionar solução celular a um frasco T150, adicionar Concanavalina A para uma concentração final de 3 µg/mL e incubar a 37 °C durante cerca de 15 horas.

Recolher as células, lavar com PBS, congelar o sedimento celular em gelo seco e prosseguir imediatamente para processos de isolamento de RNA convencionais.

B. Células mononucleares de sangue periférico de macaco cinomólogo e coelho (PBMC)

Aplicar cerca de 7 mL de sangue total de macaco cinomólogo ou 10 mL de sangue total de coelho branco New Zealand num BD Vacutainer™ CPT™ System para separação de células mononucleares de sangue total. Centrifugar o tubo da preparação de células CPT durante 20 min a 1500 x de gravidade num rotor de balde de baloço horizontal. Recolher linfócitos e monócitos na interface, lavar duas vezes com solução do meio, contar e ressuspender em solução do meio a uma concentração final de  $10^6$  células/mL. Adicionar Concanavalina A para uma concentração final de 3 µg/mL e incubar a 37 °C durante cerca de 15 horas. Recolher as células, lavar com PBS, congelar o sedimento celular em gelo seco e prosseguir imediatamente para processos de isolamento de RNA convencionais.

Exemplo 4 Medir as Constantes Cinéticas de Ligação

É utilizado um instrumento de BIACORE® 2000 para medir a cinética e a afinidade da ligação antigénio-anticorpo. O instrumento utiliza as propriedades ópticas de

ressonância de plasmão de superfície para detectar a alteração na concentração de proteínas de moléculas de interacção numa matriz de biosensor de dextrano. Excepto se for referido em contrário, todos os reagentes e materiais são adquiridos a BIACORE® AB. Todas as medições são realizadas a 25 °C. As amostras são ressuspensas em tampão HBS-EP para uma concentração final de 2 µg/mL (150 mM de cloreto de sódio, 3 mM de EDTA, 0,005% (p/v) de tensoactivo P-20, e 10 mM de HEPES, pH 7,4). A proteína A é imobilizada nas células de fluxo 1 até 4 de um chip sensor CM4 a um nível de 500 unidades de resposta utilizando um estojo ("kit") de acoplamento de amina.

A ligação é avaliada utilizando múltiplos ciclos analíticos. Cada ciclo é realizado a uma taxa de fluxo de 50 µL/minuto e consiste nos seguintes passos: injeção de cerca de 20 µL de uma composição de anticorpo a 2 µg/mL tendo como objectivo uma captura de 100-200 unidades de resposta, injeção de 250 µL de IL-17 humana, IL-17 de macaco cinamólogo, IL-17 de coelho branco New Zealand, IL-17 de rato ou IL-17 de murganho (começando a 10 nM e utilizando diluições seriadas de duas vezes para cada ciclo) seguido por 20 minutos para dissociação, e regeneração utilizando 30 µL de cloridrato de glicina a 10 mM, pH 1,5. As taxas de associação e dissociação para cada ciclo são avaliadas utilizando um modelo de ligação de "1:1 com transferência de massa" no software BIAevaluation.

Os mAbs de comprimento total 103, 104, 118, 121, 126 e 131 (ver Tabela 1) possuindo uma região de FC de IgG<sub>4</sub> apresenta uma elevada afinidade de ligação a IL-17 humana e a IL-17 de macaco com uma  $K_D$  inferior a 5 pM, uma  $K_{off}$  mais lenta do que  $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  e uma  $K_{on}$  de pelo menos  $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . A  $K_D$  e a  $k_{off}$  são melhoradas (*i.e.*,  $K_D$  inferior,  $k_{off}$  mais lenta) nestes mAbs variantes em relação ao mAb Fab 2321 (parental Fab de *e.g.*, Fab 103 e 104) compreendendo uma região variável de murino [Seq ID Nos: 261 (VH de 2321), 262 (VL de 2321)], uma região constante de cadeia pesada de IgG<sub>4</sub> humana (SEQ ID NO: 260) e uma região constante de cadeia leve kapa (SEQ ID NO: 272). Os anticorpos da invenção apresentam uma ligação não superior aos níveis de fundo a IL-17 de murganho ou IL-17 de rato; não sendo detectada ligação até 200 nM de IL-17 de murganho e não sendo detectada ligação até 1  $\mu\text{M}$  de IL-17 de rato. Quando são testados os mAbs de comprimento total 103, 104, 121 e 126, nas mesmas condições descritas acima, para ligação a IL-17 de macaco cinomólogo e IL-17 de coelho; a ligação a IL-17 de coelho é fraca e bifásica enquanto a ligação a IL-17 de macaco é semelhante à ligação à de humano. Os valores específicos para certos mabs (os valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média) da invenção quando testados neste ensaio estão listados na Tabela 4 abaixo. Está contemplado que as regiões Fc diferentes das de IgG<sub>4</sub> não afectam significativamente  $K_D$  e  $k_{off}$ .

Tabela 4

<b>IL-17 HUMANA</b>	$K_{on}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$K_{off}$ ( $S^{-1}$ )	$K_D$ (pM)
mAB 103	$11 (\pm 2) \times 10^6$	$1,5 (\pm 0,7) \times 10^{-5}$	$1,4 (\pm 0,7)$
mAB 104	$7,7 (\pm 0,6) \times 10^6$	$1,1 (\pm 0,5) \times 10^{-5}$	$1,7 (\pm 0,9)$
mAB 118	$5 \times 10^6$	$2 \times 10^{-5}$	3,9
mAB 121	$10 (\pm 0,9) \times 10^6$	$1,5 (\pm 0,3) \times 10^{-5}$	$1,6 (\pm 0,4)$
mAB 126	$7,5 (\pm 0,4) \times 10^6$	$1,3 (\pm 0,2) \times 10^{-5}$	$1,8 (\pm 0,3)$
mAB 131	$5,4 \times 10^6$	$1,6 \times 10^{-5}$	2,9
mAB 2321 parental	$2,7 \times 10^6$	$6 \times 10^{-5}$	7
<b>IL-17 CYNO</b>	$K_{on}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$K_{off}$ ( $S^{-1}$ )	$K_D$ (pM)
mAB 103	$8,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^{-5}$	1,3
mAB 104	$9,4 \times 10^6$	$0,5 \times 10^{-5}$	0,5
mAB 121	$7,8 (\pm 0,3) \times 10^6$	$0,7 (\pm 0,2) \times 10^{-5}$	$1,1 (\pm 0,04)$
mAB 126	$7,9 (\pm 0,3) \times 10^6$	$0,7 (\pm 0,6) \times 10^{-5}$	$0,8 (\pm 0,8)$
<b>IL-17 de COELHO<sup>a</sup></b>	$K_{on}$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$K_{off}$ ( $S^{-1}$ )	$K_D$ (pM)
mAB 103	$1,8 \times 10^5$ $10,6 \times 10^6$	$3,6 \times 10^{-4}$ $19,2 \times 10^{-2}$	2 18,1
mAB 104	$1,0 (\pm 0,1) \times 10^5$ $4,0 (\pm 2) \times 10^6$	$1,8 (\pm 1,0) \times 10^{-4}$ $7,0 (\pm 2) \times 10^{-2}$	$1,9 (\pm 1,3)$ $20 (\pm 6)$
mAB 121	$8 (\pm 6) \times 10^5$ $17 (\pm 11) \times 10^6$	$4 (\pm 3) \times 10^{-4}$ $2,1 (\pm 0,22) \times 10^{-2}$	$0,51 (\pm 0,13)$ $1,5 (\pm 1,0)$
mAB 126	$1,5 (\pm 0,6) \times 10^5$ $9 (\pm 3) \times 10^6$	$1,7 (\pm 0,5) \times 10^{-4}$ $11 (\pm 2) \times 10^{-2}$	$1,3 (\pm 0,6)$ $14 (\pm 4,0)$
<sup>a</sup> A ligação é bifásica e os resultados são ajustados com modelo de ligação ao ligando heterogéneo resultando duas afinidades.			

Exemplo 5 Estudos de Competição da Ligação Receptor IL-17/Anticorpo anti-IL-17

Este exemplo demonstra que os anticorpos da invenção competem para a ligação a IL-17 com o receptor de IL-17.

Os estudos de ligação de BIACORE são realizados utilizando a proteína de fusão receptor de IL-17 Fc (R&D #177-IR). Para demonstrar que a proteína de fusão IL-17 receptor Fc liga-se a IL-17 humana, é realizado um ensaio BIACORE em tampão de ligação de BIACORE (HBS-EP) + 1 mg/mL de BSA a 25 °C num instrumento BIACORE 2000. É utilizado um chip CM4 com aproximadamente 600 unidades de resposta de Proteína A imobilizada nas células de fluxo 1, 2 e 3 do chip. Aproximadamente 100 unidades de resposta da proteína de fusão IL-17 receptor Fc são capturadas em células de fluxo 2 do chip. A IL-17 humana é então exposta às células de fluxo 1 e 2 em concentrações que variam desde 600 nM até 9,4 nM. Após cada 250 µL de injeção da IL-17 humana, o complexo é deixado a dissociar durante cerca de 12 minutos fazendo passar tampão pelo chip. No final da dissociação, é utilizada uma injeção de 20 µL de glicina a 100 mM a pH 1,5 para regenerar o chip antes que o ciclo seguinte da ligação comece. A célula de fluxo 1 é utilizada como uma célula de fluxo de referência. Os resultados são ajustados utilizando o modelo "Analito bivalente" no software BIAevaluation Versão 3.2. Os resultados indicam que esta interacção possui uma taxa de iniciação de  $1,06 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ , uma taxa de eliminação de  $20,3 \text{ s}^{-1}$  e uma taxa de eliminação lenta de  $1,63 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Por isso, esta interacção possui uma  $K_D$  ou afinidade de ligação de 1,5 nM e 0,19 mM que é muito mais fraca do que as afinidades de ligação dos anticorpos da invenção à IL-17 humana.

A ligação para a experiência de competição é também medida em HBS-EP + 1 mg/mL de BSA a 25 °C num instrumento BIACORE 2000 com um chip CM4. São imobilizadas aproximadamente 1000 unidades de resposta de um anticorpo da invenção nas células de fluxo 2, 3 e 4 do chip; a célula de fluxo 1 é deixada em branco. Utilizando uma taxa de fluxo de 50 µL/mL, são injectados 25 µL de 500 nM de IL-17 humana ao longo de todas as quatro células de fluxo, formando o complexo anticorpo:antigénio na superfície do chip. Após a injeção estar completa e o complexo ser formado, 250 µL de 500 nM de proteína de fusão IL-17 humana receptor Fc é injectado ao longo de todas as quatro células de fluxo. No final desta injeção é utilizada uma injeção de 25 µL de glicina a 100 mM pH 1,5 para regenerar o chip. A mesma experiência de ligação é então repetida utilizando uma injeção de 250 µL de tampão em vez da proteína de fusão IL-17 receptor Fc.

Os perfis de ligação para a injeção do receptor em relação ao complexo anticorpo: antigénio e para a injeção de controlo de tampão em relação ao complexo anticorpo:antigénio são idênticos. Isto indica que não existem sítios de ligação disponíveis para a IL-17 dimérica se ligar ao seu receptor assim que estiver ligado a um anticorpo da invenção. Este resultado também indica que o receptor não é capaz de "puxar" a IL-17 para longe de qualquer um dos anticorpos assim que o complexo se forme. Estes anticorpos podem inibir a IL-17 humana de se ligar ao seu receptor, neutralizando desse modo a actividade biológica da IL-17 humana.

Exemplo 6A Ensaio de Repórter de IL-8 *in vitro*

Para testar a capacidade de um anticorpo da invenção neutralizar ou antagonizar uma bioatividade de IL-17, pode utilizar-se o ensaio de repórter de IL-8 aqui descrito. Esta abordagem pode também ser utilizada para determinar a potência de Fabs ou mAbs da invenção num ensaio baseado em células. A linha celular de Hs27 humana (ATCC #CRL-1634) secreta IL-8 em resposta a IL-17. A secreção de IL-8 induzida por IL-17 é inibida através da neutralização de anticorpos anti-IL-17 (ver, *e.g.*, *J. Imm.* 155:5483-5486, 1995 ou *Cytokine* 9:794-800, 1997). Consequentemente, a secreção de IL-8 induzida por IL-17 deve prosseguir sem constrangimento se for adicionado suficiente IL-17 às células HS27 na ausência do anticorpo neutralizante anti-IL-17.

As células HS27 são mantidas em meio de ensaio: meio de glucose elevada DMEM sem vermelho de fenol (Invitrogen #31053-028) com 10% de soro de bovino fetal, 4 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, penicilina G (100 U/500 mL) e estreptomicina (100 µg/500 mL). As células são cultivadas em frascos T150 até estarem cerca de 80-90% confluentes no dia do ensaio. A IL-17 humana (R&D Systems, #317-IL-050) é reconstituída em PBS estéril sem Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> armazenado congelado, descongelado de fresco para utilização e diluído para 200 ng/mL em meio de ensaio. É adicionada uma fracção de 50 µL da IL-17 diluída, a cada

poço de uma placa de cultura de tecidos de fundo liso de 96 poços (Falcon #35-3072) com as paredes externas deixadas vazias. Os poços em duplicado são utilizados para um controlo apenas do meio (100 µL/poço) e controlo apenas de IL-17 (100 µL/poço). O teste é realizado em duplicado ou triplicado. As proteínas de mAb de comprimento total estéreis são diluídas para uma concentração máxima de 24 µg/mL em meio de ensaio. São realizadas diluições em série (tipicamente 1:5) numa placa de ensaio separada e são adicionados 50 µL das amostras de Fab nas várias diluições às paredes que contêm IL-17 depois incubadas a 37 °C durante 1 hora. O meio de ensaio isoladamente é utilizado como um controlo negativo.

As células HS27 (tipicamente cerca de 20 000 células em 100 µL de meio de ensaio) são adicionadas a cada poço da placa contendo Fab + IL-17 (ou controlos) e incubadas durante cerca de 48 horas a 37 °C. Os sobrenadantes do meio são então recolhidos após a centrifugação das placas de 96 poços durante 5 minutos a 500 vezes de gravidade e diluídos 1:15 ou 1:10 em meio de ensaio. O nível de neutralização de IL-17 é medido através da determinação das quantidades de IL-8 no sobrenadante utilizando um estojo ("kit") de ELISA comercial de acordo com as instruções do fabricante, excepto que o meio de ensaio é substituído por diluente convencional e o volume do substrato é de 100 µL/poços (R&D Systems, ELISA D-8000C ou R&D DuoSet ELISA #DY208hIL-8). As medições da ELISA (450 nm) são realizadas num leitor de microplacas. As curvas de

calibração são obtidas utilizando um ajuste logístico de 4 parâmetros com valores de IL-8 (pg/ml) determinados a partir das curvas de calibração utilizando técnicas estatísticas convencionais. Os valores de IC<sub>50</sub> são obtidos utilizando técnicas estatísticas convencionais.

Os mAbs de comprimento total 103, 104, 121 e 126 da invenção (com a região Fc de IgG<sub>4</sub>), quando testados no ensaio descrito (2-4 replicações), possuem uma IC<sub>50</sub> média (baseada num peso molecular estimado de 150 kD para cada mAb) entre 450 e 500 pM com a vantagem de todos os valores medidos entre 365 e 618 pM.

#### Exemplo 6B Ensaio *In vitro* de repórter de GRO $\alpha$

Para testar a capacidade de um anticorpo da invenção neutralizar ou antagonizar uma bioatividade de IL-17, pode utilizar-se o seguinte ensaio à base de célula. A IL-17 pode estimular células epiteliais e outras células para segregar GRO $\alpha$ . A capacidade de um anticorpo da invenção para neutralizar a secreção de GRO $\alpha$  induzida por IL-17 a partir da linha de células epiteliais de adenocarcinoma colorrectal humanas HT-29 é testada neste ensaio.

Para testar se a IL-17 humana induzia forma dependente da dose a secreção de GRO $\alpha$  pelas células HT-29, IL-17 recombinante (R&D Systems #317-IL-050/CF; reconstituída em PBS de Dulbecco estéril sem Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> (D-PBS)) é diluída (para 4.,5  $\mu$ g/mL; 3X a maior concentração de teste)

em meio de ensaio/cultura (McCoy's 5A (Invitrogen); 10% de FBS (Invitrogen); penicilina G (100 U/500 mL); e estreptomicina (100 µg/500 mL. A IL-17 é, além disso, diluída de forma seriada (1:5) em meio de ensaio. As várias concentrações de IL-17 (0,096 ng/mL - 1 500 ng/mL; 3,0 pM - 46 875 pM) são dispensados (50 µL cada) em poços internos de uma placa de 96 poços de cultura de tecidos tratada. O meio de ensaio (50 µL) é dispensado em 3 poços para um tratamento "só com meio". O teste é efectuado em triplicado (3 poços por tratamento). A placa contendo IL-17 em meio de ensaio é incubada durante aprox. 60-90 minutos a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, antes da adição de células HT-29.

Para avaliação de um anticorpo da invenção, e.g., o mAb 126 com uma região Fc de IgG<sub>4</sub>, uma concentração de IL-17 que produziu aproximadamente 70% de secreção máxima de GRO $\alpha$  a partir das células HT-29 é utilizada (60 ng/mL). A IL-17 humana recombinante (R&D Systems) é diluída (para 240 ng/mL; 4X a concentração de trabalho) em meio de ensaio/cultura. A IL-17 diluída é dispensada (50 µL) em 60 poços internos separados de placas de cultura de tecidos de 96 poços tratadas (Becton Dickinson Falcon #35-3072). O meio de ensaio (50 µL) é dispensado em 3 poços para um tratamento "só com meio".

Um intervalo de dose de um anticorpo da invenção a ser testado é tipicamente de 2,56 -40 000 pM. Numa placa de diluição separada, o anticorpo da invenção e o anticorpo de controlo (estéril, em 1X PBS, pH 7,4) são diluídos para 160 000 pM em meio de ensaio. O anticorpo da invenção e

anticorpo de controlo são, além disso, diluídos de forma seriada (1:5) em meio de ensaio. Cada concentração de teste do anticorpo da invenção a ser testado é depois adicionado (50 µL) a poços contendo IL-17. O teste é tipicamente efectuado em triplicado. O meio de ensaio isolado (50 µL) é utilizado para os controlos "só de meio" e "só de IL-17". As placas contendo misturas de IL-17 e anticorpo da invenção são incubadas durante 60-90 minutos a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, antes da adição de células HT-29.

As células HT-29 (células epiteliais de adenocarcinoma colorrectal humano, ATCC #HTB-38), são mantidas em meio de cultura/ensaio em frascos de cultura de tecidos tratados utilizando técnicas convencionais. As células HT-29 são cultivadas em frascos de cultura de tecidos até se obter 50-80% de confluência no dia do ensaio. No dia do ensaio, as células são lavadas com HBSS (Cambrex #CC-5024) e raspadas dos frascos de cultura com tripsina + EDTA. A tripsina é inactivada com meio de ensaio completo. As células HT-29 são então centrifugadas a 500Xg durante 5 min. a TA. O sedimento de células é depois ressuspensas em meio de ensaio e 20 000 células HT-29 (em 100 µL) são adicionadas a cada poço de tratamento das placas de 96 poços. Um igual volume de D-PBS é adicionada a cada um dos poços fronteira não utilizados (sem célula) para reduzir efeitos de margem resultantes da evaporação. As placas de 96 poços foram colocadas numa incubadora de cultura de tecidos (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>) durante aproximadamente 48 horas.

No final do ensaio, as placas são centrifugadas (500Xg durante 5 min. À TA), e o meio de cultura de células é transferido para placas de 96 poços de polipropileno. Os níveis de GRO $\alpha$  são medidos com uma ELISA sanduíche para GRO $\alpha$  (R+D Systems DuoSet #DY275), conforme as instruções do fabricante, excepto para: utilização de meio de ensaio como o diluente convencional, utilizando tampão de lavagem de ELISA 1X de BioFX Labs, utilizando uma amostra e volume padrão de 50  $\mu$ L por poço, utilizando um substrato de BioFX Labs (substrato de HRP, #TMBW-1000-01), e utilizando uma solução de paragem de BioFX Labs (#LSTP-1000-01) (100  $\mu$ L por poço). No final das reacções ELISA, as placas são lidas a 450 nm num leitor de microplacas. As curvas de calibração para GRO $\alpha$  são obtidas efectuando um ajuste logístico de 4-parâmetros. Os valores de GRO $\alpha$  (concentração em pg/mL) para as amostras são obtidos a partir das curvas de calibração. A linha de células epiteliais de adenocarcinoma colorrectal humano HT-29 segregou GRO $\alpha$  quando estimuladas com IL-17, numa forma dependente da dose (Tabela 5). A IgG4 de controlo humana não causa um decréscimo na secreção de GRO $\alpha$  induzida por IL-17. Estes resultados (Tabela 6) demonstram que o mAb 126 é capaz de neutralizar completamente a secreção de GRO $\alpha$  induzida pela IL-17 humana - a partir de células HT-29 *in vitro* utilizando as condições descritas. O valor de IC<sub>50</sub> para o mAb 126 neste ensaio é de aproximadamente 560 pM.

**Tabela 5**

IL-17 humana (ng/mL)	GRO $\alpha$ AVG (pg/mL)	DP
1 500,00	2 420,4	311,8
300,00	2,047,5	509,9
60,00	1,556,0	209,0
12,00	960,0	24,9
2,40	502,5	12,3
0,48	297,9	6,3
0,10	205,8	4,8
0	1492	16,7

Abreviaturas: AVG = média; DP = Desvio Padrão.

**Tabela 6**

Anticorpo conc., pM	mAb 126		controlo negativo IgG <sub>4</sub>	
	AVG pg/mL	GRO $\alpha$ , DP	AVG GRO $\alpha$ , pg/mL	DP
40 000,0	123,8	1,4	1 297,3	29,4
8 000,0	134,1	6,4	1 419,9	133,4
1 600,0	151,3	9,5	1 370,4	114,7
320,0	1 170,6	56,0	1 388,6	54,1
64,0	1 340,8	59,1	1 380,4	36,0
12,8	1 362,0	21,1	1 346,2	81,6
2,56	1 280,9	56,1	1 243 4	118,3
0 (só IL-17)	1 201,4	66,1		
Só Meio	117,2	10,0		

Abreviaturas: conc. = concentração; AVG = média; DP = Desvio padrão.

Exemplo 7 Neutralização *In vivo* de hIL-17

A IL-17 humana é capaz de se ligar e estimular o receptor de IL-17 de murganho, levando a uma elevação e subsequente secreção da quimiocina KC de murganho (CXCL1). As experiências de intervalo de tempo e dosagem são realizadas para identificar a dose óptima de IL-17 humana e o tempo óptimo para a indução de KC de murganho. Estas experiências indicam que uma dose de 150 µg/kg de IL-17 humana e um tempo de 2 horas pós administração de IL-17 produz níveis máximos de KC no soro de murganho. Os anticorpos completos da presente invenção (e.g., Fab 126 ou Fab 121 com HCVR ligado operacionalmente ao Fc de IgG4 humana, SEQ ID NO:260 [ou SEQ ID NO: 278] e o LCVR ligado operacionalmente a uma região constante kapa humana, SEQ ID NO: 263 [ou SEQ ID NO: 277]) são administrados intravenosamente a murganhos a 1, 10, 100 e 1000 µg/kg, uma hora antes da injeção subcutânea da IL-17 humana. Duas horas após administração de IL-17 humana, os murganhos são sacrificados e os níveis de KC são determinados por ELISA utilizando um estojo ("kit") comercialmente disponível de acordo com as instruções do fabricante (KC Quantikine, R&D). Os anticorpos com isotipo correspondente são utilizados como controlos negativos. Os anticorpos bloqueiam a capacidade da IL-17 humana para estimular o receptor de IL-17 de murganho, levando à inibição de uma elevação de KC de murganho, numa forma dependente da dose.

O Mab126 (um anticorpo completo compreendendo Fab 126), a uma dose de 20 µg/murganho sob as condições descritas, diminui o nível médio de KC em aproximadamente quatro vezes em comparação com um anticorpo de controlo que não produzia efeito. O Mab 121, a uma dose de 20 µg/murganho sob as condições descritas, diminui o nível médio de KC em aproximadamente três vezes em comparação com um anticorpo de controlo.

#### Exemplo 8 Mapeamento de Epitopo

Dois dos anticorpos anti-IL-17 (Fab 126 e Fab 104) são utilizados para determinar que se humanização e optimização do Fab de murino parental (2321, SEQ ID NOs: 261 e 262) não altera a capacidade de ligação ao epitopo dos Fabs resultantes da humanização e optimização do parental. Os Fabs humanizados, optimizados ligam-se ao mesmo epitopo como o faz o Fab de murino parental como determinado por uma ELISA de competição convencional ou por troca de H-D e análise de espectrometria de massa para mapeamento de epitopo (ver, e.g., Hoofnagle, A., et al., *Methods Mol. Biol.* 250:283-298, 2004; Hoofnagle, A., et al., *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 32:1-25, 2003; Baerga-Ortiz, A., et al., *Protein Sci* 11:1300-8, 2002) deste modo, espera-se que os Fabs 1-132 da invenção derivados do mesmo Fab parental, se liguem ao mesmo epitopo.

Utilizando a troca de H-D e o ensaio de espectrometria de massa (H/DXMS) para mapear o epitopo, é determinado que os aminoácidos entre 80 e 89 [ADGNVDYHMN (SEQ ID NO: 266)] da IL-17 humana (SEQ ID NO: 1) estão compreendidos no epitopo descontínuo ao qual os anticorpos da invenção se ligam. A DGNVDYH (SEQ ID NO: 267) é uma sequência essencial compreendida no epitopo descontínuo ao qual os anticorpos da invenção se ligam com base na comparação da variação da sequência de IL-17 entre diferentes espécies e da capacidade de ligação. A alteração da sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 267 no contexto de toda a sequência IL-17, resulta em ligação não detectável à IL-17 alterada por um anticorpo da invenção. Os anticorpos da invenção não se ligam a IL-17 de rato ou murganho em níveis superiores ao do anticorpo de controlo.

O ensaio de H/DXMS é utilizado para identificar as regiões de IL-17 a que os anticorpos da invenção se ligam. A taxa da velocidade de troca de hidrogénio de amida é dependente da estrutura e acessibilidade do solvente do hidrogénio da amida. O IL-17 livre ou o complexo de IL-17:anticorpo em água é misturado com água deuterada (D<sub>2</sub>O) para permitir a troca de prótons de amida por deutério. Os grupos amida da estrutura que participam na ligação da proteína são protegidos da troca e permanecem protonados. Estas regiões são então identificadas por proteólise péptica, acoplada com LC e espectrometria de massa por ionização por electrospray. A IL-17 humana contendo uma His

e Flag tag C-terminal (IL-17-Flis) é expressa e purificada a partir de células GS-CHO utilizando uma coluna IMAC. Duas alíquotas de 10 µg (7,7 µL) da solução de IL-17-Flis são transferidas para 2 Microcon, e 100 µg de mAb 104 ou mAb 126 (proporção molar de IL-17/Mab = 1/2) é adicionado no Microcon. Vinte µg de solução de IL-17-Flis são transferidos para outro Microcon e sem adição de anticorpo. Depois, é adicionado tampão PBS 1X em cada Microcon para um volume final de ~180 µL e centrifugadas a 14 000g durante 14 min. Depois são adicionados 150 µL de tampão PBS 1x em cada Microcon e centrifugadas a 14 000g durante 14 min. Estes passos são necessários para assegurar que o antigénio livre e o complexo de antigénio:anticorpo estão em condições de tampão idênticas.

A porção de proteína é recolhida e o volume final é ajustado para 50 µL (complexo) ou 80 µL (IL-17-Flis apenas) com 1xPBS. Seis microlitros de IL-17-Flis ou complexo de IL-17-Flis e complexo mAb são transferidos para um microtubo de plástico, e 14 µL de 100% de D<sub>2</sub>O são adicionados, resultando em 70% de D<sub>2</sub>O na amostra. A solução é incubada à temperatura ambiente durante 10 min. A troca é imediatamente interrompida, digerida por adição de 20 µL de 1% de ácido fórmico e 2 µL de 2 mg/mL de solução de pepsina, e incubada à temperatura ambiente durante 30 s ou a 0 °C durante 10 min. O digerido é imediatamente injectado numa coluna manualmente. São utilizados Waters 2795 HPLC e Micromassa LTC Premier para todos os ensaios. A corrente de

HPLC a partir da bomba de HPLC é ligada a um tubo de metal (cerca de 1 mL), ao injetor manual, a uma coluna Zorbax C18 (2,1 x 50 mm) que migra sob estas condições (Temperatura da Coluna: 0 °C; Fase Móvel C: 0,15% de ácido fórmico em H<sub>2</sub>O, D: 0,12% ácido fórmico em ACN; Tempo de Corrida: 23 min). A coluna é equilibrada com 98% de A (0,15% de solução aquosa de ácido fórmico) e 2% de B (0,12% de ácido fórmico em acetonitrilo) a uma taxa de fluxo de 0,2 mL/min. Uma eluição de gradiente é realizada de 2% a 10% de B durante 0,5 min, depois para 40% de B durante 14,5 min, depois para 90% de B durante 1 min com 2 min de espera, e depois voltou para 2% de B em 1 min.). A amostra de HPLC é analisada pelo espectrómetro de massa operado com estas condições (Modo de Ião: Positivo; Intervalo de Varrimento de Massa: 300-2000; Voltagem no Cone de Amostra: 80; Fluxo de Gás de Dessolvatação (L/Hr): 700; Temp de Dessolvatação: 300 °C). O tubo de metal, ansa injetora e a coluna são submergidos em água com gelo ao longo do ensaio. O espectro de massa de cada péptido péptico de IL-17 é obtido após troca H/D com ou sem um mAb anti-IL-17 testado. Para péptidos pequenos, a massa média de cada péptido é calculada com base nos seus iões isotópicos e intensidades. Para péptidos maiores, as massas médias são obtidas a partir do espectro de massa desconvoluído após calibração interna.

Quando o anticorpo forma um complexo com IL-17, a região de ligação (epitopo) de IL-17 é protegida do sol-

vente. Isto leva a taxas mais lentas de troca amida de hidrogénio em comparação com os de IL-17 isolados. Comparando a massa de péptidos do livre e do complexo após troca de deutério, os péptidos protegidos pela formação do complexo devem ser diferentes dos péptidos correspondentes na IL-17 livre. A Tabela 7 a seguir lista as diferenças de massa que são obtidas por H/DXMS para péptidos pécticos de IL-17. Estes péptidos pécticos cobrem toda a sequência de IL-17-Flis. Como os dados da Tabela demonstram, a diferença de massa do péptido IL-17-Flis entre o complexo e si mesmo é semelhante para ambos os anticorpos testados, *i.e.* estes ligam-se ao mesmo epitopo. Uma principal diferença de massa é encontrada para o péptido péctico 24-87+117-133 (*i.e.*, os aminoácidos 24 a 87 e 117 a 133 de IL-17) (estes dois péptidos são conectados através de ligação persulfureto) e 66-87+117-134, sugerindo que os resíduos nestas regiões são envolvidos na ligação. Uma vez que estes péptidos pécticos são bastantes grandes, são necessárias outras digestões enzimáticas para encurtar os resíduos de aminoácidos específicos envolvidos na ligação. Em adição a estes dados, os anticorpos da invenção não se ligam a outro membro da família de IL-17 (IL-17 B, C, D, E, e F) e estas também não se ligam a IL-17 de murganho ou de rato. Estes dados em conjunto com comparação de sequências e exame do modelo de homologia estrutural de IL-17 sugere que os resíduos 80-89 estão compreendidos num epitopo não linear de IL-17 ao qual se ligam os anticorpos da invenção.

Tabela 7

Péptido péptico	IL-17-Flis+mAb104		IL-17-Flis+mAb126	
	Média (n=3)	DP	Média (n=3)	DP
1-23+98-116	-0,36	0,61	-0,78	0,59
24-43	-0,79	0,13	-0,44	0,65
27-42	-0,56	0,17	-0,56	0,38
24-65	-1,32	0,54	-1,17	0,19
54 a 65	-0,17	0,37	-0,53	0,25
24-87+117-133	-3,60	0,38	-4,09	0,29
66-87+117-134*	-1,94		-2,38	
88-97	-0,30	0,8	-0,29	0,14
11-116	-0,08	0,07	-0,17	0,08
135-151	-0,14	0,03	-0,12	0,12

**Nota:** delta Massa é obtido por subtração de uma massa média de péptido péptico de IL-17-Flis apenas a partir da média da massa do péptido correspondente do complexo IL-17-Flis e anticorpo.

\* este dado é de uma digestão de 10 min a 0 °C (n=1). Todas as outras são de digestão ambiente durante 0,5 min.

## Exemplo 9 Expressão de IL-17 em Tecidos de Cancro

Vários lisados de células não cancerosas e cancerosas humanas são testados para a presença de proteína IL-17. Os tecidos (aproximadamente 50-100 mg por pedaço) são congelados em gelo seco, descongelados em gelo e lisado em 350 µL de tampão TPER (Pierce #78510) incluindo inibidores de protease (Pierce #78410) e inibidores de

fosfatase em tubos contendo esferas de lise de cerâmica (Qbiogene #6913-050; 1,4 mm de esferas de cerâmica em tubos de 2,0 mL). Os tubos são colocados em gelo durante 5-10 min, depois centrifugadas a 13 000 x gravidade durante 10 min a 4 °C e o material transferido para tubos novos para remover os resíduos. Recentrifugar como descrito e transferir para novo tubo. A concentração de proteína é determinada utilizando um método padrão de BSA. As amostras são analisadas para IL-17 utilizando um estojo ("kit") comercial de ELISA para IL-17 de acordo com as instruções do fabricante (R&D #DY317 utilizando tampão de lavagem, solução de substrato e solução de paragem de BioFX Labs). Os níveis de IL-17 são normalizados para a concentração de proteína total. Os níveis de IL-17 são aumentados entre duas e três vezes em tecido do cólon canceroso (60 amostras testadas) em comparação com o tecido normal do cólon (63 amostras testadas). Os níveis de IL-17 são aumentados em média três a quatro vezes em tecido de rim canceroso (21 amostras testadas) em comparação com tecido normal de rim (21 amostras testadas). Os níveis de IL-17 em tecido da próstata canceroso (44 amostras testadas) são aumentados em comparação com o tecido normal da próstata (7 amostras testadas). Os níveis de IL-17 não foram elevados em outros tipos de tecido de tumor testado incluindo mama, pescoço, pulmão, laringe, tiróide, língua, ovário e cérebro.

Exemplo 10 Ativação de Células da Microglia por IL-17

A IL-17 induz a secreção por uma linha de células

da microglia do cérebro de murino (BV-2) de IFN e IL-12p70. A linha de células da microglia de murino BV-2 [obtida por Scios, com permissão de Elisabeta Blasi (Microbiology University of Perugia, Itália) que as isolou originalmente (E. Blasi *et al.*, *J. Immunology* 1990, 27:229-237)] é cultivada em frascos de cultura de tecidos revestidos com poli-D-lisina, até não mais do que 60% de confluência em DMEM rico em glicose (Invitrogen #31053-028) com 2 mM de L-glutamina (Invitrogen/GIBCO #25030-081), 10% de FBS (inativado pelo calor; Invitrogen/GIBCO #10082-147), 1 mM de piruvato de sódio (Invitrogen/GIBCO #11360-070), 100 µg/mL de Normocina (InvivoGen) a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>.

No dia 0 do ensaio, as células BV-2 são lavadas (PBS de Dulbecco sem Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>; Invitrogen), raspadas (0,25% de tripsina + EDTA) seguidas por inativação por tripsina e depois centrifugadas (500Xg 5 min. a TA). O precipitado de células resultante é ressuspensão numa densidade de células de ~7 000 células/100 µL de meio de cultura. 100 µL da suspensão de células são dispensados em 60 poços internos separados de placas de 96 poços de cultura de tecidos tratadas revestidas com poli-D-lisina. As placas são incubadas como descrito, durante aprox. 48 h antes do tratamento com IL-17.

No dia 2 do ensaio, IL-17 de murganho recombinante (mIL-17) (sem veículo; R&D Systems); reconstituída em PBS de Dulbecco estéril sem Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> são diluídos numa placa de polipropileno para 1,5 µg/mL (a maior concentração

de teste) em meio de cultura. A IL-17 de murganho é, além disso, diluída em série na placa de polipropileno. Um controlo positivo é LPS diluído em meio de cultura para 1 µg/mL (a maior concentração de teste). O meio do ensaio é utilizado como um controlo negativo. O meio é suavemente aspirado das células, antes de adicionar os tratamentos (150 µL/poço). O teste é realizado em triplicado (3 poços por tratamento). As placas separadas replicadas são incubadas durante 24 hr. ou 48 hr. a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>.

Nos dias 3 e dia 4 do ensaio, as placas são centrifugadas (500Xg durante 5 min. TA), depois o meio da cultura de células é transferido para placas de propileno de 96 poços, que são selados e congelados (-80 °C). As amostras de meio são descongeladas e ensaiadas para os níveis de citocina e quimiocina com um estojo ("kit") murino 22-plex multiplex (Linco), conforme as instruções do fabricante (excepto: um placa de filtro de policarbonato de parede preta (Millipore) substitui a placa de filtro incluída no estojo ("kit")). A fluorescência é lida num instrumento Luminex® (50 esferas por conjunto de esferas, marcação de baixo ganho de RP1). Os dados são apresentados na Tabela 8 a seguir.

As curvas padrão são obtidas utilizando um ajuste logístico de quatro ou cinco parâmetros. Os valores de IFN $\gamma$  e IL-12p70 (pg/mL) são determinados a partir das curvas padrão utilizando técnicas estatísticas convencionais.

Tabela 8

24 horas após tratamento com IL-17		
Conc. de mIL-17, µg/mL	IFN $\gamma$ média pg/mL	IL-12p70 média pg/mL
1,5	125,87	65,58
0,375	123,89	59,63
0,0938	125,61	67,87
0,0059	58,91	38,12
0,0015	18,78	12,34
só meio de controlo	abaixo do limite de detecção	abaixo do limite de detecção
LPS, 1 µg/mL	5,11	51,11
LPS, 0,25 µg/mL	5,07	49,00
48 horas após tratamento com IL-17		
Conc. de mIL-17, µg/mL	IFN $\gamma$ média pg/mL	IL-12p70 média pg/mL
1,5	134,38	61,48
0,375	124,99	58,65
0,0938	119,96	58,15
0,0059	47,07	27,87
0,0015	13,97	9,44
só meio de controlo	abaixo do limite de detecção	abaixo do limite de detecção
LPS, 1 µg/mL	5,20	46,37
LPS, 0,25 µg/mL	4,30	36,36

Exemplo 11 Modelo de indução de DSS do Distúrbio do Intestino Irritável

IBD é uma doença inflamatória crónica que inclui a doença de Crohn e a Colite Ulcerativa. Os níveis de proteína IL-17 são significativamente elevados no soro e nos tecidos do cólon de doentes com colite ulcerativa e doença de Crohn. Contudo, IL-17 não é detectável no soro de indivíduos normais, ou doentes com colite infecciosa ou colite isquémica. O modelo DSS (Dextrano Sulfato de Sódio) é um dos mais antigos e mais representativos modelos pré-clínicos para a doença do intestino irritável (IBD). No modelo DSS (ver, *e.g.*, *FASEB Journal*. 2004;18:1550-1552) as lesões inflamatórias agudas e crónicas são induzidas. Os murganhos têm um elevado grau de uniformidade das lesões com perda de peso corporal e de comprimento do cólon. É reproduzível no que respeita à duração e gravidade entre os murganhos individuais. Para a indução de doença, os murganhos recebem 5% de DSS (30-40 Kd) na água de beber durante 7 dias. O Índice de Actividade de Doença (DAI) incluindo a hemorragia hemoculta positiva ou rectal, fezes soltas e perda de peso corporal (5-8%) é observado por volta do dia 8. Os pesos corporais dos murganhos são monitorizados todos os dias durante 2 semanas. Os murganhos são sacrificados cerca de dia 12 a cerca do dia 15. A proteína IL-17 é significativamente aumentada no cólon tratado com DSS versus o cólon naïve. O tratamento com anticorpo para IL-17 pode reduzir índice de actividade de doença.

## Exemplo 12 Modelo EAE para Esclerose Múltipla

A EAE é uma doença desmielinante mediada por células T CD4+ do sistema nervoso central (SNC) que serve como um modelo para MS em humanos. Os mecanismos patogénicos do desenvolvimento de EAE incluem a activação de células T específicas para o antigénio e diferenciação de Th1 seguida por infiltração de células T e macrófagos no SNC. A IL-17 contribui para a patologia da esclerose múltipla (MS). A análise de microarray de lesões de MS de doentes humanos demonstrou um aumento de IL-17 (Lock, *et al. Nat. Med.* 8:500-508, 2002). O mRNA que expressa IL-17 de células mononucleares (MNC) no sangue e fluido cérebro-espinal são significativamente elevados em número em doentes com MS e foram detectados números elevados do mRNA que expressa IL-17 em MNC do sangue durante a exacerbação clínica de MS em comparação com remissão (Matusevicius, *et al. Multiple Sclerosis.* 5:1-1-104, 1999). A EAE é significativamente suprimida em murganhos sem IL-17 (Nakae *et al., J. Immun.* 171:6173-6177).

O exemplo aqui descrito demonstra que a proteína IL-17 é aumentada na espinal medula de murganhos EAE e o tratamento com um anticorpo anti-IL-17 de murino reduz a classificação de EAE no modelo activo de EAE. Para a indução da doença, murganhos fêmea de 8-9 semanas de idade C57BL/6 são subcutaneamente imunizados no dia 0 com (i) 200 µL de 5 mg/mL de toxina *pertussis* (PT) e Adjuvante Completo de Freund (CFA) ou (ii) PT, CFA e 300 µg/200 µL de

MOG35-55 (glicoproteína de oligodendrócito de mielina emulsificada em CFA contendo 5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* inactivada pelo calor). No dia 2, os murganhos são tratados de novo com PT. Os murganhos são classificados ao longo do estudo para níveis de parálise. Espera-se a doença no grupo que recebeu MOG. Um anticorpo monoclonal IgG1 anti-IL-17 de murino de rato ou anticorpo controlo de isotipo é administrado a murganhos nos dias 1, 7 e 15 (BD Biosciences para anticorpo anti-IL-17 de murino de rato). Os murganhos que receberam MOG são sacrificados quando a classificação clínica atinge entre 1-3 (numa escala de 0-4); isto é entre os dias 14-31 para o estudo 1 na Tabela 9 a seguir e entre os dias 14-16 para o estudo 2 na Tabela 10 a seguir. Os sinais clínicos de doença desenvolveram-se por volta do dia 10. Os animais individuais são subjectivamente classificados por pelo menos 2 classificadores independentemente e cegos para a identidade dos grupos de tratamento de acordo com a gravidade clínica da doença do SNC. Grau 0 é normal; Grau 1 é cauda completamente mole; Grau 2 é fraqueza do membro traseiro parcial unilateral; Grau 3 é parálise completa do membro traseiro; e Grau 4 é moribundo, (ver *J. Exp. Med.* 194: 873-881, 2001). Um murganho controlo é sacrificado no mesmo dia dos murganhos tratados com MOG. As medulas espinais são isoladas na altura do sacrifício e imediatamente congeladas para serem utilizadas para análise da proteína IL-17 por ELISA. O grupo de tratamento com o anticorpo para IL-17 tem significativamente menos classificação de doença em comparação com o grupo de controlo de isotipo.

Os lisados de cada medula espinal completa são feitos em 1 mL (estudo 1 na Tabela 9 a seguir) ou 0,4 mL (estudo 2 na Tabela 7 a seguir) de reagente de extração de proteína TPER (Pierce #78510) com inibidores totais de protease (Roche Applied Science #11697498), em tubos de 2 mL contendo esferas de cerâmica (matriz de lise D, QBiogene #6913050), e instrumento FastPrep (Bio101) durante 30 segundos numa escala de 5,5. Após a lise, as amostras são centrifugadas (5 min. a 14 000 rpm numa microcentrífuga) para remover os resíduos. Os sobrenadantes são transferidos para novos tubos de microcentrífuga. A concentração de proteína total em cada lisado é determinada com um estojo ("kit") de ensaio de proteína BCA (Pierce #23225), utilizando o protocolo da microplaca do fabricante. Os lisados são congelados e armazenados a -80 °C.

Após descongelar os lisados em gelo, e clarificar por centrifugação, os níveis de IL-17 de murganho são medidos em amostras não diluídas por ELISA (R&D Quantikine #M1700) conforme as instruções do fabricante. As curvas padrão são obtidas utilizando um adaptador logístico de quatro parâmetros. Os valores de IL-17 são determinados a partir das curvas padrão utilizando técnicas estatísticas convencionais. Os níveis de IL-17 são normalizados para a concentração de proteína em cada amostra e expressos como pg de IL-17/mL de proteína total em cada lisado nas Tabelas 9 e 10 a seguir. Como demonstrado pelos dados nas Tabelas, os níveis aumentados de IL-17 foram detectados em murganhos EAE.

**Tabela 9**

<b>ESTUDO 1</b>				
GRUPO	INTERVALO DE VALORES DE mIL-17 pg/mg	mIL-17 MÉDIO (pg/mg) ( $\pm$ EP)	INTERVALO DE CLASSIFICAÇÕES CLÍNICAS NO SACRIFÍCIO	CLASS. CLIN. MÉDIA NO SACRIFÍCIO ( $\pm$ EP)
Naíve (n=7)	3,63-10,06	5,19 $\pm$ 0,87	N/A	N/A
CFA (n=14)	3,16-7,51	4,31 $\pm$ 0,33	N/A	N/A
CFA+MOG (n=14)	4,12-16,62	8,57 $\pm$ 1,01	0,9-3,0	1,74 $\pm$ 0,20

Todos os valores de ELISA de IL-17 estavam no intervalo de detecção da ELISA., média de duplicados

**Tabela 10**

<b>ESTUDO 2</b>				
GRUPO	INTERVALO DE VALORES DE mIL-17 pg/mg	mIL-17 MÉDIO (pg/mg) ( $\pm$ EP)	INTERVALO DE CLASSIFICAÇÕES CLÍNICAS NO SACRIFÍCIO	CLASS. CLIN. MÉDIA NO SACRIFÍCIO ( $\pm$ EP)
CFA (n=6)	1,88-2,78	2,24 $\pm$ 0,14	N/A	N/A
CFA+MOG (n=8)	1,78-5,42	3,34 $\pm$ 0,45	2,75-3,20	2,94 $\pm$ 0,06

Todos os valores de ELISA de IL-17 estavam no intervalo de detecção da ELISA., média dos duplicados

Exemplo 13 Modelo de artrite induzido por Colagénio

A artrite induzida por colagénio (CIA) é um modelo de roedor vastamente utilizado para a artrite reumatóide ("RA") e possui características histopatológicas em comum com a RA humana. A artrite experimental, induzida em murganhos DBA/1 por imunização e reforço com emulsões de colagénio do tipo II, é uma doença poliartrítica caracterizada por inflamação das pequenas articulações e erosão progressiva da cartilagem e osso (Trentham, D, *et al*, *J. Exp. Med.* 146:857-858, 1977). Recentemente, Lubberts, *et al*, (*Arthritis & Rheumatism*, 50:650-659, 2004; aqui incorporado) demonstrou que o anticorpo policlonal anti-IL-17 de murino de coelho, administrado no início ou num estágio mais avançado da CIA de murino, melhorou os sinais clínicos de artrite.

No modelo CIA, os murganhos a que foi dado um injeção única do mAb IgG2a anti-IL-17 de murino de rato intraperitonealmente (8 mg/kg R&D, MAB421 clone 50104.11) apresentam classificações clínicas significativamente inferiores às dos murganhos injectadas com 16 mg/kg de IgG2a de rato de controlo. O reagente de forma aguda, proteína C reactiva (CRP), é um índice de forma semelhante a CRP, a proteína amiloide do soro de murino (SAP) serve como um indicador de doença no modelo CIA de murino

(Bliven, M., *et al*, *Arthritis & Rheumatism*, 29:1131-1138, 1986). Em animais tratados com 8 mg/kg de anti-IL-17 de murino, os níveis de SAP foram significativamente inferiores aos dos tratados com anticorpo de controlo. além disso, a diminuição nas classificações clínicas e valores de SAP são comparáveis a um grupo anti-IL-1 $\beta$  de murgancho (8 mg/kg) utilizado como um controlo positivo. Finalmente, a significativa redução na inflamação sinovial a 8 mg/kg de anticorpo e reabsorção de osso a 16 mg/kg de anticorpo está presente em comparação com a de murganhos tratados com anticorpo de controlo. Pode ser conduzido um estudo de resposta a dose no modelo CIA com anticorpo anti-IL-17 de murino (*e.g.*, a 0,1, 1 e 8 mg/kg). As classificações clínicas para apresentação de anti-IL-17 de murino de rato apresenta uma tendência de resposta a dose. Um ensaio semelhante pode ser efectuado em macacos cinomólogos como um modelo para RA, utilizando um anticorpo da invenção.

#### Exemplo 14 Purificação do mAb Anti-IL-17

Um vector que expressa um mAb da invenção é estavelmente incorporado numa célula hospedeira apropriada, (*e.g.*, células CHO DG44 (dhfr-) (Chasin) ou células NS) utilizando procedimentos convencionais e purificado utilizando uma coluna de afinidade para a Proteína A. Resumidamente, o meio condicionado clarificado é aplicado a uma coluna de 5 mL de HiTrap rProtein A Sepharose FF (Amersham Biosciences) que tinha sido equilibrada com PBS (pH 7,4). A coluna é lavada com 5 volumes de coluna de

tampão de equilíbrio a uma taxa de fluxo de 110 cm/hr para arrastar para fora componentes de ligação não específicos. O anticorpo ligado é eluído utilizando um gradiente linear de pH (0,1 M de tampão de fosfato de sódio, pH 6,8 a 0,1 M tampão de citrato de sódio pH 2,5). O pico principal de proteína na eluição é recolhido e o seu pH é ajustado para a neutralidade com 1 M de tampão Tris (pH 8,5). A mistura de proteína é concentrada para 1-2 mg/mL utilizando membrana 10K Vivaspin (Vivasciences) e filtrado de forma estéril (0,45 µm) antes do armazenamento a 4 °C.

Para grandes preparações de um mAb da invenção, o concentrado isento de células é purificado em três colunas de cromatografia sequenciais (cromatografia de Proteína A, Troca Iónica, e de Interação Hidrofóbica). A pureza do mAb após estes passos de cromatografia é superior a 99% conforme avaliado por cromatografia analítica de exclusão de tamanho. O mAb é trocado num tampão como listado a seguir dependendo da concentração do anticorpo. Os resultados de estabilidade química indicam um pH preferido entre 6,0 e 7,0 (inclusive); embora para preparações de 20 mg/mL, o pH possa estar entre 5,5 e 7,0 (inclusive, e.g., 5,5,, 5,6, 5,7,, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 ou 7,0). Para o produto liofilizado, é preferido um nível de cloreto de sódio de 90-30 mM (90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35 ou 30 mM ou qualquer valor entre 30 e 90 mM), enquanto para uma formulação líquida (e.g., para ser administrada subcutaneamente) é preferido um nível de cloreto de sódio de 100 - 150 mM

(100, 110, 120, 130, 140, ou 150 mM ou qualquer valor entre 100 e 150 mM). O produto é depois concentrado para uma concentração final de 20 ou 25 mg/mL (alternativamente maior, 30, 40, 50, 60, 70, superior) e filtrado de forma estéril. O produto filtrado pode ser imediatamente congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  ou pode ser liofilizado. Uma proporção de peso mínima de 1:2 de anticorpo para lipoprotector, (e.g., sacarose ou trealose) é necessária para a formulação liofilizada estável mas não é necessária para uma formulação líquida. Adicionalmente, 0,02% de tensioactivo (p/v), i.e., polissorbato-80, é adicionado para as formulações em solução e para as soluções a ser liofilizadas. O material liofilizado é ressuspenso em Água estéril para Injecção ou cloreto de sódio a 0,9% antes da administração.

**Tabela 11**

<u>conc. de mAb</u>	<u>Tampão</u>	<u>pH</u>	<u>NaCl (mM)</u>
10 mg/mL	cittrato a 10 mM(Na)	6,0	30, 50-150
20 mg/mL	cittrato a 10 mM	5,5	50-150
20 mg/mL	cittrato a 10 mM	6,0	50-150
20 mg/mL	cittrato a 10 mM	6,5	50-150
20 mg/mL	cittrato a 10 mM	7,0	50-150
20 mg/mL	histidina a 10 mM	6,5	150
>50 mg/mL	cittrato a 10 mM	5,5	50-150
>50 mg/mL	cittrato a 10 mM	6,0	50-150
>50 mg/mL	cittrato a 10 mM	6,5	50-150
>50 mg/mL	histidina a 10 mM	6,5	150

## Exemplo 15

Semi-vida de Anticorpo *in vivo*

A farmacocinética no soro dos anticorpos da invenção (e.g., mAb 126 e 121 [região Fc de IgG4 com Fab 126 ou 121 respectivamente]) é determinada após administração intravenosa ou subcutânea em macacos machos cinomólogos. As concentrações dos anticorpos no soro são determinados utilizando um ensaio de ELISA de captura de antigénio padrão em que as placas são revestidas com IL-17 humana e o anticorpo do soro ligado é detectado utilizando um anticorpo anti-IgG<sub>4</sub> secundário. Após administração intravenosa de 1 mg/kg, mAb 126 é eliminado com uma semi-vida média de 6,5 dias e o mAb 121 é eliminado com uma semi-vida média de cerca de 11 dias. Após administração subcutânea de 1 mg/kg, o mAb 126 possui uma semi-vida de eliminação média de 10,3 dias e o mAb 121 possui uma semi-vida de eliminação média de 13 dias.

## Exemplo 16 Modelo de Xenoenxerto de Tumor

Para estabelecer quais os modelos de xenoenxerto de tumor com para testar a actividade anti-tumoral de anticorpos anti-IL-17 da invenção, 5 milhões de células de carcinoma colorrectal HCT116 são misturadas com Matrigel e subcutaneamente injectadas no flanco esquerdo de um murgancho fêmea de 56 semanas de idade atímico (nu/nu) murganchos (Charles River laboratories, Wilmington, MA). Os

murganhos são tratados por injeção subcutânea em cada 7 dias com anticorpos de controlo (e.g., IgG4 humana e IgG1 de murganho), 4 mg/kg de anti-IL-17 humana, 8 mg/kg de anti-IL-17 de murganho, ou combinação de 4 mg/kg de anti-IL-17 humana e 8 mg/kg anti-IL-17 de murganho durante 4 semanas. A primeira administração de anticorpo começa um dia antes do implante das células. Os tumores são medidos duas vezes em cada semana com um paquímetro e o peso corporal é monitorizada duas vezes por semana. O plasma é recolhido de cada murganho ao dia 34 e os níveis de KC são medidos utilizando um estojo ("kit") KC ELISA de acordo com as instruções do fabricante (R&D System). Em comparação com murganhos controlo injectados com IgG, os murganhos tratados com a combinação de anticorpo anti-IL-17 humana e anticorpo anti-IL-17 de murganho reduziram significativamente o volume de tumor. Para além disso, os murganhos tratados com ambos o anticorpo anti-IL-17 humana e anticorpo anti-IL-17 de murganho diminuíram dramaticamente a KC no plasma. Os murganhos tratados com 4 mg/kg de anticorpo anti-IL-17 humana ou 8 mg/kg de anticorpo anti-IL-17 de murganho não revelaram redução significativa no volume de tumores e níveis de KC no plasma. Os dados são aqui apresentados nas Tabelas 12 e 13.

Para medir o nível de IL17 nos tumores, os tumores de modelos de xenoenxerto de murganho são vastamente preparados como descrito no Exemplo 9. Para a medição de proteína, os lisados de tumor são diluídos 1:10 em TPER + 1X Halt numa placa de propileno de diluição de 96 poços. A

concentração de proteína é determinada utilizando o protocolo do Coomassie Plus Protein Assay (Pierce #23236) em microplaca. O padrão de BSA é diluído em TPER + Halt. Os níveis de proteína de IL-17 são determinados utilizando estojos ("kits") ELISA para IL-17 humana e de murganho de R&D System de acordo com as instruções do fabricante (human IL-17 DuoSet ELISA, R+D Systems, Cat. #DY317; mouse IL-17 ELISA, R+D System, Cat. # 421). A IL-17 humana e de murganho foram aumentadas em tumores de modelos de xenoenxerto de tumor do cólon HCT 116 e HT29 em comparação com o modelo de xenoenxerto de tumor de pulmão H460.

**Tabela 12 Volume de Tumor**

(n=10)		
Tempo, dias (pós implante das células HT116)	IgG1 de rato+controles de isotipo IgG4 humana (Média±EP)	Anti IL-17 de murganho + anti-IL-17 humana (Média±EP)
8	101,4±6,7	91,5±9,4
14	149,2±9,2	123,9±16,2
17	162,1±12,4	134,6±14,7
20	177,7±17,1	152,8±18,7
24	279,2±22,8	222,4±35,4
28	323,3±22,5	244,6±32,8
31	405,8±33,4	275,1±36,6
34	537,7±50,7	339,8±46,3
Volume de tumor é calculado utilizando o LogVol, método AR		

**Tabela 13 Níveis de Quimiocina KC no Plasma 35 dias pós-implante**

GRUPO	INTERVALO DE VALORES DE KC, pg/mL	KC médio, pg/mL (±EP)
IgG1 de Rato + controlos do isotipo IgG4 humano	76,3-168,4	112,5±10,0
Anti IL-17 de murganho + anti-IL-17 humana	55,6-110,5	84,7±5,7
PERCENTAGEM MÉDIA DA DIFERENÇA DE KC (grupo anti-IL-17 comparado com o grupo de controlo de isotipo): 24,7%		

Lisboa, 7 de Setembro de 2011

**REIVINDICAÇÕES**

1. Anticorpo monoclonal anti-IL- 17 humanizado em que o referido anticorpo compreende:

- a) um péptido com SEQ ID N° 131 em CDRL1,
- b) um péptido com SEQ ID N° 167 em CDRL2,
- c) um péptido com SEQ ID N° 168 em CDRL3,
- d) um péptido com SEQ ID N° 26 em CDRH1, e
- e) um péptido com SEQ ID N° 52 em CDRH3

2. Anticorpo monoclonal anti-IL-17 de acordo com a reivindicação 1, em que o referido anticorpo compreende um LCVR com SEQ ID N° 241 e um HCVR som DEQ ID N° 118.

3. Um anticorpo humanizado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 2, em que o anticorpo é um anticorpo de comprimento total, um anticorpo substancialmente intacto, um fragmento Fab, um F(ab')<sub>2</sub> ou um fragmento Fv de cadeia única.

4. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, em que o anticorpo compreende ainda uma região constante de cadeia pesada seleccionada a partir de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM e IgD.

5. Composição compreendendo o anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e em que a

referida composição compreende ainda um veículo farmacêuticamente aceitável.

6. Anticorpo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, para utilização como medicamento.

7. Anticorpo de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, para utilização no tratamento de um ou mais estados seleccionados a partir de artrite reumatóide, distúrbio inflamatório da bexiga, psoríase e esclerose múltipla.

Lisboa, 7 de Setembro de 2011

Figura 1 Família IL-17 (humana)

```

1
IL-17      MTPGKTSLSVS LLLLLSLEAI VKAGITIPR- NPGCPNSEDK
IL-17B    ----MDWPHN LLFLLTISIF LGLGIP4WP- KWKRKGQGRP
IL-17C    ----MTLLPG LLFLTWLHTC LAHNDPSLRG HPHSHGTPHC
IL-17D    -----MLV AGFLLALPPS WAAGAPRAGR RPARPRGCAD
IL-17E    MRERPRLGED SSLISLFLQV VAFLAMVMGT HTYSHWPSCC
IL-17F    --MVKYLLLS ILGLAFLSEA AARKIPKVG- HTFFQKPESC

41
IL-17      NFPRTVMVNL NIHNRTNTN P-----
IL-17B    GPLAPGPHQV PLDLVSRMKP YARMEEYERN IBEMVAQLRN
IL-17C    YSAEELPLQA PPHLIARGAK WQALPVALV SSLEAASHRG
IL-17D    RPEELLEQLY GRLAGVLSA FHHTLQLGPR EQARNASCPA
IL-17E    PSKGQDTSEE LLRWSTVPVP PLEPARPNRH PESCRAS---
IL-17F

81
IL-17      -----KR SSDYYNRSTS PWNLHRNEDP
IL-17B    SSELAQRKCE VN-----LQ LWMSNKRSLP PWGYSINHDP
IL-17C    RHERPSATTQ CPVLRPEEVL EADTHQRSIS PWRYRVDTDE
IL-17D    GGRPADR--- -----RF RPPTNLRSVS PWAYRISYDP
IL-17E    -----E DGPLNSRAIS PWRYELDRDL
IL-17F    -----SM SRNIESRSTS PWNYYTVTNDP

121
IL-17      ERYPSVIWEA KCRHLGCINA D--GNVDYHM NSVPIQQEIL
IL-17B    SRIPVDLPEA RCLCLGCVNP FT-MWEDRSM VSVPVFSQVP
IL-17C    DRYPQKLAPA ECLCRGCIDA RT-GRETAAL NSVRLQLSLL
IL-17D    ARYPRYLPEA YCLCRGCLTG LF-GEEDVRF RSAPVYMPYV
IL-17E    NRLPQDLYHA RCLCPHCVSL QTGSHMDPRG NSELLYHNQT
IL-17F    NRYPSEVVQA QCRNLGCINA Q--GKEDISM NSVPIQQETL

161
IL-17      VLRREPPHCP NS----- -FRLEKILVS VGCTCVTPIV
IL-17B    VRRRLCPPPP RTG-----PC RQRAVMETIA VGCTCIF---
IL-17C    VLRRRPCSRD GSGLPTEGAF AFHTEFIHVP VGCTCVLPRS
IL-17D    VLRRTPACAG GRS----- VYTEAYVTIP VGCTCVPEPE
IL-17E    VFYRRPCHGE KGTHKG---Y CLEFFLYRVS LACVCVRPRV
IL-17F    VVRRKHQGCS VS----- -FQLEKVLVT VGCTCVTPVI

201
IL-17      HHVA-----
IL-17B    -----
IL-17C    V-----
IL-17D    KDADSINSSI DKQGAKLLLG PNDAPAGP
IL-17E    MG-----
IL-17F    HHVQ-----

228
          (SEQ ID NO: 1)
          (SEQ ID NO: 2)
          (SEQ ID NO: 3)
          (SEQ ID NO: 4)
          (SEQ ID NO: 5)
          (SEQ ID NO: 6)

```

Figura 2

IL-17

mouse  
rat  
rabbit  
human  
monkey

```

* * * * *
MSPGRASSVSLMLLLLLSLAATVKAATIPQSSACPNTAKDELQNVKVNLIKVFNSLGAK
MSPRRIPSMCLMLLLLLNLEATVKAAVLIQSSVCPNAEANNFLQNVKVNLIKVINSLSSK
MSLGRISVSVSL--LLLLCLVATVKNGIAMPNPGCPNAEDKNFPQNVKVSILNLIK---S
MTPGKTSLVSL--LLLLSLEAIVKAGITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNR-NTN
MTEGKTSLVLL--LLLLSLEAIVKAGIAIPRNSGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNR-NTS
    
```

mouse  
rat  
rabbit  
human  
monkey

```

* * * * *
VSSRRPSDYLNRRSTSPWTLHRNEDPDRYPSVIWEAQCRHQRCVNAEGKLDHMHNSVLIQQ
ASSRRPSDYLNRRSTSPWTLHRNEDPDRYPSVIWEAQCRHQRCVNAEGKLDHMHNSVLIQQ
VNSRRPSDYLNRRSTSPWTLHRNEDRERYPSVIWEAKCRHLGCVNAEGNEDHMHNSVPIQQ
TNPKRSSDYLNRRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCVNADGNVDYHMHNSVPIQQ
TNPKRSSDYLNRRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCVKADGNVDYHMHNSVPIQQ
    
```

mouse  
rat  
rabbit  
human  
monkey

```

*****
EILVLKREPESCPFTFRVEKMLVGVGCTCVASIVRQAA- (SEQ ID NO:7)
EILVLKREPEKCPFTFRVEKMLVGVGCTCVSSIVRHAS- (SEQ ID NO:8)
EILVLRRESQHCPSFRLEKMLVAVGCTCVTPIIHHMAX (SEQ ID NO:9)
EILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA- (SEQ ID NO:1)
EILVLRREPRHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVAX (SEQ ID NO:10)
    
```

## REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

*Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.*

### Documentos de patentes citadas na Descrição

- \* WO 2004106377 A
- \* US 4816567 A
- \* US 5545806 A
- \* US 5545807 A
- \* EP 125023 B1
- \* US 4816397 A
- \* EP 120694 B1
- \* WO 8601533 A
- \* EP 194276 B1
- \* US 5225 A
- \* US 538 A
- \* EP 238400 B1
- \* US 5585089 A
- \* US 5698762 A
- \* US 6284471 B
- \* US 5807715 B
- \* US 4816567 B
- \* US 4816397 B
- \* WO 2005005604 A
- \* WO 9404679 A, Carter
- \* US 5693761 A
- \* US 5225639 A
- \* US 5569825 A
- \* US 5589369 A
- \* US 5591669 A
- \* US 5625126 A
- \* US 5633425 A
- \* US 5681016 A
- \* US 5625825 A
- \* US 5770429 A
- \* US 5789650 A
- \* US 5814318 A
- \* US 5612205 A
- \* US 5721367 A
- \* US 5789215 A
- \* EP 0643981 A1

### Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- \* Yao, Z. et al. *Immunity*, 1995, vol. 3, 811
- \* Kolls ; Linden. *Immunity*, 2004, vol. 21, 467-476
- \* Fossiez et al. *Int. Rev. Immunol.*, 1998, vol. 16, 541
- \* Witkowski et al. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2004, vol. 61, 567-579
- \* Lubberts et al. *Arthritis & Rheumatism*, 2004, vol. 50, 650-659
- \* Giavedoni, L. D. *Journal of Immunological Methods*, June 2005, vol. 301 (1-2), 88-101
- \* Moseley, T a et al. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, April 2003, vol. 14 (2), 155-174
- \* Hofstetter et al. *Cellular Immunology*, October 2005, vol. 237 (2), 123-130
- \* Pluckhun. *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*. Springer-Verlag, 1984, vol. 113, 269-315
- \* Kabat et al. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1971, vol. 190, 382-93
- \* Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. NIH Publication No. 91-3242, 1991
- \* Kohler et al. *Nature*, 1975, vol. 256, 495
- \* Jakobovits et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551-2555
- \* Jakobovits et al. *Nature*, 1993, vol. 362, 255-258
- \* Matthews DJ ; Wells JA. *Science*, 1993, vol. 260, 1113-7
- \* Hanes et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1998, vol. 95, 14130-5
- \* Samuelson P. et al. *Journal of Biotechnology*, 2002, vol. 96, 128-54
- \* Kieck M.C. et al. *Protein Engineering*, 1997, vol. 10, 1309-10
- \* Little M. et al. *Immunology Today*, 2000, vol. 21, 364-70
- \* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, 1989
- \* *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates, 1989
- \* Bird et al. *Science*, 1988, vol. 242, 423-8
- \* Huston et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 5879-83
- \* McCafferty et al. *Nature*, 1990, vol. 348, 552-4
- \* Urlaub ; Chasin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216-20
- \* Kaufman ; Sharp. *J. Mol. Biol.*, 1982, vol. 158, 601-21
- \* Taylor et al. *Nucleic Acids Res.*, 1982, vol. 20, 6287-95

- Jones et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525
- Riechmann et al. *Nature*, 1986, vol. 322, 323-329
- Presta. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-595
- Kettleborough, C.A. et al. *Protein Engineering*, 1991, vol. 4, 773-783
- Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. U.S. Government Printing Office, 1991
- Queen et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 2889
- Levitt, M. *J. Mol. Biol.*, 1983, vol. 168, 595-620
- Riechmann et al. *Nature*, 1986, vol. 322, 323-327
- Verhoeyen et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536
- Hoogenboom ; Winter. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381
- Marks et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581
- Cole et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. Alan R. Liss, 1985, 77
- Boerner et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 86-95
- Marks et al. *BioTechnology*, 1992, vol. 10, 779-783
- Lonberg et al. *Nature*, 1994, vol. 368, 856-859
- Morrison. *Nature*, 1994, vol. 368, 812-13
- Fishwild et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-51
- Neuberger. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 826
- Lonberg ; Huszar. *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93
- Jakobovits et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551
- Bruggemann et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 88, 6709-6713
- Mendez et al. *Nature Genetics*, 1997, vol. 15, 146-156
- Graen ; Jakobovits. *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 186, 483-485
- Hunter et al. *Nature*, 1962, vol. 144, 945
- David et al. *Biochemistry*, 1974, vol. 13, 1014
- Pain et al. *J. Immunol. Meth.*, 1981, vol. 40, 219
- Nygren. *J. Histochem. and Cytochem.*, 1982, vol. 30, 407
- Zola. *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*. CRC Press, Inc, 1987
- *Ann. Rheum. Dis.*, 2000, vol. 59, 529-32
- *J. Immunol.*, 2001, vol. 167, 1004-1013
- *J. Immunol.*, 2003, vol. 171, 8173-8177
- *Multiple Sclerosis*, 1999, vol. 5, 101-104
- Remington *The Science and Practice of Pharmacy*. Mack Publishing Co, 1995
- *J. Imm.*, 1995, vol. 155, 5483-5486
- *Cytokine*, 1997, vol. 9, 794-800
- E. Blasi et al. *J. Immunology*, 1990, vol. 27, 229-237
- *FASEB Journal.*, 2004, vol. 18, 1550-1552
- Lock et al. *Nat. Med.*, 2002, vol. 8, 500-508
- Matusevicius et al. *Multiple Sclerosis.*, 1999, vol. 5, 1-1104
- Nakae et al. *J. Immun.*, vol. 171, 8173-8177
- *J. Exp. Med.*, 2001, vol. 194, 873-881
- Trentham, D et al. *J. Exp. Med.*, 1977, vol. 146, 857-858
- Bliven, M. et al. *Arthritis & Rheumatism*, 1986, vol. 29, 1131-1138