



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 333 260**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06813945 .0**
96 Fecha de presentación : **30.08.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1933869**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2008**

54 Título: **Uso de antagonistas de IL-23 e IL-17 para tratar la enfermedad inflamatoria ocular autoinmunitaria.**

30 Prioridad: **01.09.2005 US 713792 P**
11.08.2006 US 837312 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.02.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.02.2010

73 Titular/es: **Schering Corporation**
2000 Galloping Hill Road
Kenilworth, New Jersey 07033-0530, US
The Government of the United States of America
as represented by The Secretary of the
Department of Health and Human Services

72 Inventor/es: **Cua, Daniel, J.;**
Kastelein, Robert, A.;
Tsai, Van, T.;
Caspi, Rachel;
Silver, Phyllis y
Luger, Dror

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 333 260 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de antagonistas de IL-23 e IL-17 para tratar la enfermedad inflamatoria ocular autoinmunológica.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a la modulación de las respuestas inmunológicas en el ojo. De forma más específica, la invención se refiere al uso de antagonistas de interleuquina-23 (IL-23) y/o interleuquina-17 (IL-17) para tratar una enfermedad inflamatoria ocular autoinmunológica.

10 **Antecedentes de la invención**

La enfermedad ocular inflamatoria ("ocular inflammatory disease" (OID)) es una expresión general que incluye una serie de enfermedades y trastornos en que la inflamación afecta al ojo o a los tejidos circundantes. El nombre de diagnóstico que se da a una OID se basa de forma típica en el emplazamiento de la inflamación ocular. Por ejemplo, la uveitis es la inflamación del tracto uveal; la escleritis es la inflamación de la esclerótica; la pars planitis es la inflamación de la pars plana, etc. Las OID provocan dolor, irritación y lagrimeo, y pueden provocar la pérdida de la función visual. Por ejemplo, la uveitis es la tercera causa destacada de ceguera en el mundo desarrollado. Las OID pueden ser provocadas por infecciones, malignidad, exposición a toxinas, respuesta a la cirugía o a las lesiones, y trastornos autoinmunológicos.

Existe una serie de enfermedades autoinmunológicas en que el ojo o diversas partes del ojo se convierten en diana de un ataque inflamatorio inmunológicamente mediado. Los pacientes con OID inmunológicamente mediadas (AOID) a menudo muestran respuestas celulares y humores a antígenos retinianos, como la arrestina retiniana (antígeno retiniano soluble, S-Ag), la proteína de unión a retinoides interfotorreceptores (IRB), y antígenos relacionados con la melanina y su metabolismo, incluyendo GP100, MART1, TRP1 y TRP2 (Pennesi, G. *et al.* (2003), *J. Clin. Invest.*, 111:1171-1180; Gocho, K. *et al.* (2001), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 42:2004-2009; Sugita, S. *et al.* (1996), *Int. Immunol.*, 8:799-803; Yamake, K. *et al.* (2000), *J. Immunol.*, 165 :7323-7329. Sin embargo, en muchos casos de AOID no se conoce el antígeno o antígenos diana.

A menudo, la OID es una manifestación de una enfermedad autoinmunológica sistémica, y el ojo es uno de los órganos a lo largo del cuerpo que está siendo atacado. Los ejemplos de estas enfermedades autoinmunológicas sistémicas incluyen la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la poliartritis nodosa, la policondritis recurrente, la granulomatosis de Wegener, la escleroderma, la enfermedad de Behcet, la enfermedad de Reiter, la enfermedad del intestino inflamatoria (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn) y la espondilitis anquilosante. Sin embargo, el ojo puede ser la única diana específica afectada en enfermedades autoinmunológicas como el penfigoide cicatricial ocular, la úlcera corneal de Mooren, y diversas formas de uveitis.

Las AOID, como la uveitis, se han tratado mediante diversas clases de compuestos, incluyendo esteroides y agentes antiinflamatorios no esteroideos, como dexametasona, fluometolona, prednisolona, indometacina, aspirina, flubiprofeno y diclofenaco. Sin embargo, una serie de casos de uveitis no responden o se hacen refractarios a estos fármacos (véase, por ejemplo, Kulkarni, P. (2001), *Journal of Ocular Pharmacology And Therapeutics*, 17:181-187). Además, estos fármacos están asociados con efectos secundarios graves, como cataratas, glaucoma, retraso en la curación de heridas, una producción alterada de prostaglandina, complicaciones corneales, una mayor presión ocular, superinfecciones, y una menor inmunidad frente a infecciones (véase, por ejemplo, *Id.*, en 181; Guidera, A.C., *et al.* (2001), *Ophthalmology*, 108:936-944; Olsen, E.G. y Davanger M. (1984), *Acta Ophthalmol.*, 62:893-899).

Debido a que las terapias existentes para las AOID tienen menos que una eficacia óptima o efectos secundarios indeseables, se necesitan nuevos regímenes de tratamiento. Se ha sugerido que puede ser beneficioso desde el punto de vista clínico modular los mecanismos inmunorreguladores implicados en la patogénesis de las AOID (Caspi, R.R. (2002), *Int. Rev. Immunol.*, 21:197-208).

Estos mecanismos patogénicos se han investigado utilizando la uveitis autoinmunológica experimental (EAU), que es un modelo animal de la uveitis autoinmunológica humana. La EAU se induce en animales experimentales, como ratón, rata, cobaya, conejo y mono, mediante una inmunización con un antígeno retiniano que ha demostrado ser reactivo en pacientes con uveitis (por ejemplo, arrestina, IRBP, rodopsina/opsina, fosducina, recoverina) o mediante infusión de células T específicas para estos antígenos. Los estudios que emplean el modelo de EAU proporcionan pruebas aparentemente contradictorias acerca de los mecanismos para la inducción y el avance de esta enfermedad. Los resultados de algunos experimentos indican que la principal vía patogénica en la EAU es debida al papel de la interleuquina-12 (IL-12) para estimular la generación de células efectoras Th1 productoras de IFN- γ (Caspi, R.R. (2002), *Int. Rev. Immunol.*, 21:197-208; Tarrant, T.K. *et al.* (1998), *J. Immunol.*, 161:122-127; Caspi, R.R. (1998), *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 88:4-13; Xu, H. *et al.* (1997), *Cell Immunol.*, 178:69-78). Sin embargo, otros experimentos demuestran que ratones "knock-out" (genéticamente modificados) deficientes en IFN- γ son susceptibles a la EAU, que la EAU es exacerbada por la neutralización de la IFN- γ endógena, y que unos niveles elevados de IFN- γ protegen frente a la EAU en ratones de tipo salvaje (Caspi, R.R. *et al.* (1994), *J. Immunol.*, 152:890-899; Jones *et al.*, *J. Immunol.*, 158:5997-6005; Tarrant, T.K. *et al.* (1999), *J. Exp. Med.*, 189:219-230).

Así, antes de la presente invención no estaba clara cuál es la vía inmunológica que debe fijarse como objetivo para desarrollar terapias para prevenir o tratar la enfermedad inflamatoria ocular.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en los descubrimientos de que (1) el bloqueo de la actividad interleuquina-23 (IL-23) o de la actividad interleuquina-17 (IL-17) evita la inducción de la EAU; (2) después de la inducción, la neutralización de la actividad IL-17 inhibe o revierte el avance de la EAU, pero la neutralización de la actividad IL-23 tiene poco o ningún efecto; y (3) la actividad IL-17 no es necesaria para la inducción de la EAU. La presente invención utiliza antagonistas de IL-23 y/o IL-17 en los métodos y las composiciones para tratar o prevenir la enfermedad inflamatoria ocular autoinmunitaria. Estos antagonistas antagonizan la citoquina diana en sí misma o un receptor funcional para la citoquina diana.

La IL-23 es una citoquina heterodimérica formada por dos subunidades: p19, que es exclusiva de IL-23; y p40, que comparte con IL-12. La IL-23 media en la señalización mediante su unión a un receptor heterodimérico, formado por IL-23R e IL-12RBeta1 (IL12RB1), que es compartido con el receptor IL-12. Un reciente informe indica que IL-23 estimula una población de células T que se caracteriza por la producción de IL-17, IL-17F, TNF, IL-6 y otros factores, y denomina a estas células "células Th₁₇" (Langrish *et al.* (2005), J. Exp. Med., 201:233-240)).

La IL-17, que se al principio se denominó antígeno 8 asociado con linfocitos T citotóxicos (CTLA8) es una citoquina homodimérica que se une a IL-17RA (también conocido como IL17R) e IL-17C. Se cree que el receptor funcional para IL-17 es un complejo de receptor multimérico que comprende uno o ambos de IL-17RA e IL-17RC (por ejemplo, un homodímero IL-17RA, un homodímero IL-17RC, o un heterodímero IL-17RA/IL-17RC) y probablemente una tercera proteína, aún desconocida (Toy, D. *et al.* (2006), J. of Immunol., 177(1):36-39; datos sin publicar).

En un aspecto, la invención proporciona un antagonista de IL-17 para su uso en el tratamiento de un paciente con una enfermedad inflamatoria ocular autoinmunitaria.

La presencia de una AOID puede diagnosticarse de manera no directa e inferirse mediante el diagnóstico de que un paciente tenga una inflamación ocular que tenga una etiología autoinmunitaria putativa y/o que muestre una o más características de una respuesta autoinmunitaria. Una AOID particularmente preferida es la uveitis autoinmunitaria, por ejemplo una uveitis sin una etiología infecciosa.

El antagonista de IL-17 puede inhibir la expresión de IL-17 o IL-17R o IL-17RC, o puede inhibir la señalización de IL-17 interaccionando directamente con uno o más de estos polipéptidos para evitar una interacción funcional de ligando-receptor. En algunas realizaciones preferidas, el antagonista de IL-17 es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une e inhibe la actividad de IL-17, IL17R o IL17C. En una realización particularmente preferida, el antagonista de IL-17 es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a IL-17. En otras realizaciones preferidas, el antagonista de IL-17 es un anticuerpo biespecífico que se une e inhibe la actividad de IL-23p19 e IL-17; IL-23p19 e IL-17RA; IL-23R e IL-17; o IL-23R e IL-17RA. En otra realización particularmente preferida, el antagonista de IL-17 es un anticuerpo biespecífico que se une e inhibe la actividad de IL-23p19 e IL-17.

En algunas realizaciones, el antagonista de IL-17 se administra según un régimen de tratamiento específico. Por ejemplo, en una realización, una dosis especificada del antagonista se administra en un intervalo especificado durante un primer periodo de tratamiento, que puede finalizar después de la desaparición de uno o más síntomas de la AOID, o dentro de un periodo de tiempo especificado. En una realización preferida, el régimen de tratamiento comprende además reducir gradualmente la dosis del antagonista de IL-17 durante un segundo periodo de tratamiento que empieza tras el fin del primer periodo de tratamiento y que finaliza cuando pueda detenerse la terapia con el antagonista de IL-17. La duración del segundo periodo de tratamiento es, de forma típica, entre uno y doce meses, uno y nueve meses, uno y seis meses, o uno y tres meses.

En algunas realizaciones preferidas, el régimen de tratamiento especificado también comprende la administración de un antagonista de IL-23 al paciente durante cada uno del primer y segundo periodo de tratamiento, o sólo durante el segundo periodo de tratamiento. El antagonista de IL-23 puede inhibir la expresión de cualquier subunidad de la citoquina (IL-23p19 o p40), de cualquier subunidad del receptor funcional (IL-23R o IL-12beta1), o puede inhibir la señalización de IL-23 interaccionando directamente con uno o más de estos polipéptidos para evitar una interacción funcional de ligando-receptor. En algunas realizaciones preferidas, el antagonista de IL-23 es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une e inhibe la actividad de IL-23p19 o IL-23R. En una realización particularmente preferida, el antagonista de IL-23 es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a IL-23p19.

El antagonista de IL-23 puede administrarse a una dosis especificada en un intervalo especificado durante uno o ambos del primero y segundo periodo de tratamiento. La dosis del antagonista de IL-23 administrada en el segundo periodo de tratamiento puede ser menor que la dosis administrada en el primer periodo. Además, en cualquiera o en ambos periodos de tratamiento, las dosis de los antagonistas de IL-17 e IL-23 pueden ser las mismas o diferentes. De forma similar, los dos antagonistas pueden administrarse en los mismos intervalos o en intervalos diferentes durante cada periodo de tratamiento. Durante el segundo periodo de tratamiento, la dosis del antagonista de IL-17 puede reducirse mientras que la dosis del antagonista de IL-23 se mantiene constante, o la dosis de cada antagonista puede reducirse gradualmente.

En otras realizaciones preferidas, la dosis del antagonista de IL-23 se mantiene constante durante el segundo régimen de tratamiento y la terapia con el antagonista de IL-23 continúa durante un tercer periodo de tratamiento que empieza tras finalizar el segundo periodo de tratamiento (es decir, cuando se detiene la terapia con el antagonista de IL-17). Durante el tercer periodo de tratamiento, el antagonista de IL-23 puede administrarse a la misma dosis e intervalo que en el segundo periodo de tratamiento, o puede administrarse a una dosis menor y/o con un intervalo menos frecuente que el utilizado en el periodo previo. La dosis del antagonista de IL-23 también puede reducirse gradualmente durante el tercer periodo de tratamiento. La duración del tercer periodo de tratamiento es, de forma típica, entre uno y doce meses, uno y nueve meses, uno y seis meses, o uno y tres meses.

En otras realizaciones, el régimen de tratamiento especificado también comprende administrar un agente terapéutico que no antagonice la actividad IL-17 o IL-23 pero que sea capaz de aliviar al menos un síntoma de la AOID o al menos un efecto secundario de los antagonistas de IL-17 o IL-23 durante cualquiera o todos los periodos de tratamiento. En algunas realizaciones preferidas, el agente terapéutico es un esteroide o un agente antiinflamatorio no esteroideo (por ejemplo, NSAID) conocidos por ser eficaces para tratar la uveítis. En otras realizaciones preferidas, el agente terapéutico se dirige a una citoquina que estimula la respuesta Th1.

Otro aspecto de la invención proporciona un antagonista de uno o ambos IL-23 e IL-17 para su uso en el tratamiento profiláctico de un paciente diagnosticado como susceptible de una enfermedad inflamatoria ocular autoinmunitológica.

En algunas realizaciones preferidas de este método profiláctico, el diagnóstico de susceptibilidad se basa en que el paciente haya tenido una incidencia previa de una inflamación ocular. En otras realizaciones preferidas, el diagnóstico de susceptibilidad se basa en que el paciente tenga una enfermedad autoinmunitológica sistémica. El antagonista puede administrarse en una dosis especificada en un intervalo especificado durante un primer periodo de tratamiento que finaliza, de forma típica, después de tres meses, seis meses, nueve meses o después de dos años de terapia con el antagonista. En algunas realizaciones preferidas, la dosis del antagonista se reduce gradualmente durante el segundo periodo de tratamiento que comienza tras la finalización del primer periodo de tratamiento, y que tiene una duración típica de entre uno y tres meses.

En otro aspecto, la invención proporciona un antagonista de IL-23 para su uso en el tratamiento de un paciente con una enfermedad inflamatoria ocular autoinmunitológica.

El antagonista de IL-23 puede administrarse en un intervalo especificado durante un primer periodo de tratamiento, que es seguido de un segundo periodo de tratamiento en que el antagonista de IL-23 se administra a una dosis menor o en intervalos menos frecuentes, o a dosis gradualmente reducidas. La terapia con el antagonista de IL-23 continuará de forma típica durante al menos tres a seis meses, y puede continuar hasta 12 meses, 18 meses o 24 meses.

Otro aspecto de la invención es el uso de un antagonista de IL-17 o un antagonista de IL-23 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de una enfermedad inflamatoria ocular autoinmunitológica (AOID) en un paciente. En realizaciones preferidas, la composición farmacéutica es para administrar el antagonista según cualquiera de los regímenes de tratamiento descritos en la presente.

En otro aspecto, la invención proporciona un producto de fármaco manufacturado para tratar una enfermedad inflamatoria ocular autoinmunitológica. El producto de fármaco comprende (i) una primera formulación farmacéutica que comprende un antagonista de IL-17; y (ii) una segunda formulación farmacéutica que comprende un antagonista de IL-23. En realizaciones preferidas, el producto de fármaco incluye información del producto que comprende instrucciones para administrar las formulaciones farmacéuticas según uno cualquiera de los regímenes de tratamiento descritos en la presente.

Descripción detallada

1.- Definiciones

Para que la invención pueda comprenderse con más facilidad a continuación se definen específicamente ciertos términos técnicos y científicos. A menos que se indique lo contrario en otra parte de este documento, todos los demás términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el significado que habitualmente entienden los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención cuando se utiliza en contextos similares a los empleados en la presente.

Tal como se emplea en la presente, incluyendo en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular de palabras como “un”, “una”, “el” y “la” incluyen sus correspondientes referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

“Antagonista” significa cualquier molécula que pueda evitar, neutralizar, inhibir o reducir una actividad diana, es decir, la actividad de una citoquina como IL-17 o IL-23, *in vitro* o *in vivo*. Los antagonistas de citoquinas incluyen, pero no se limitan a anticuerpos, péptidos, peptidomiméticos y polipéptidos antagonistas que se unen a una citoquina (o a cualquiera de sus subunidades) o a su receptor funcional (o a cualquiera de sus subunidades) de una manera que interfiere con la transducción de la señal de las citoquinas y la actividad corriente abajo. Los ejemplos de antagonistas peptídicos y polipeptídicos incluyen las versiones truncadas o los fragmentos del receptor de citoquinas (por ejemplo, dominios extracelulares solubles) que se unen a la citoquina de una manera que reduce la cantidad de citoquina

disponible para que se una a su receptor funcional, o que evita de otra manera que la citoquina se una a su receptor funcional. Los antagonistas también incluyen moléculas que evitan la expresión de cualquier subunidad que comprenda la citoquina o su receptor como, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido que se dirigen a ARNm, y ARN mensajero interferente (véase, por ejemplo, Arenz y Schepers (2003), *Naturwissenschaften*, 90:345-359; Sazani y Kole (2003), *J. Clin. Invest.*, 112:481-486; Pirollo, *et al.* (2003), *Pharmacol. Therapeutics*, 99:55-77; Wang, *et al.* (2003), *Antisense Nucl. Acid Drug Devel.*, 13:169-189). El efecto inhibitorio de un antagonista puede medirse mediante técnicas rutinarias. Por ejemplo, para evaluar el efecto inhibitorio sobre una actividad inducida por citoquinas, células humanas que expresan un receptor funcional para una citoquina se tratan con la citoquina y se mide la expresión de genes de los cuales se sabe que son activados o inhibidos por esta citoquina, en presencia o en ausencia de un antagonista potencial.

Los antagonistas útiles en la presente invención inhiben la actividad diana en al menos 25%, preferiblemente en al menos 50%, más preferiblemente en al menos 75%, y lo más preferiblemente en al menos 90%, cuando se comparan con un control adecuado.

“Anticuerpo” se refiere a cualquier forma de anticuerpo que muestra la actividad biológica deseada, como la inhibición de la unión de un ligando a su receptor, o la inhibición de la señalización de un receptor inducida por el ligando. Por tanto, “anticuerpo” se emplea en el sentido más amplio y específicamente cubre, pero no se limita a anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos).

“Fragmento de anticuerpo” y “fragmento de unión del anticuerpo” significan fragmentos que se unen al antígeno y los análogos de un anticuerpo que incluyen, de forma típica, al menos una porción de las regiones variables o de unión al antígeno (por ejemplo, una o más CDR) del anticuerpo de origen. Un fragmento de anticuerpo conserva al menos parte de la especificidad de unión del anticuerpo de origen. De forma típica, un fragmento de anticuerpo conserva al menos 10% de la actividad de unión del anticuerpo de origen cuando esa actividad se expresa con una base molar.

Preferiblemente, un fragmento de anticuerpo conserva al menos 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% o más de la afinidad de unión del anticuerpo de origen por la diana. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarias, por ejemplo, sc-Fv; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Se indican variantes de anticuerpos modificados genéticamente en Holliger y Hudson (2005), *Nat. Biotechnol.*, 23:1126-1136.

Un “fragmento Fab” está formado por una cadena ligera y las regiones C_H1 y variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

Una región “Fc” contiene dos fragmentos de cadena pesada que comprenden los dominios C_H1 y C_H2 de un anticuerpo. Los dos fragmentos de cadena pesada se mantienen juntos mediante dos o más enlaces disulfuro y por interacciones hidrófobas de los dominios CH3.

Un “fragmento Fab” contiene una cadena ligera y una porción de una cadena pesada que contiene el dominio V_H y el dominio C_H1 y también la región entre los dominios C_H1 and C_H2, de forma que puede formarse un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas de dos fragmentos Fab' para formar una molécula F(ab')₂.

Un “fragmento F(ab')₂” contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios C_H1 y C_H2, de manera que se forma un enlace disulfuro intercatenario entre las dos cadenas pesadas. Por tanto, un fragmento F(ab')₂ está compuesto de dos fragmentos Fab' que se mantienen juntos mediante un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

La “región Fv” comprende las regiones variables de ambas cadenas pesada y ligeras, pero carece de las regiones constantes.

Un “anticuerpo Fv monocatenario”(o “anticuerpo scFv”) se refiere a fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En general, el polipéptido de Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para un informe sobre los scFv, véase Pluckthun (1994), *THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315. Véase también la publicación de solicitud de patente internacional n° WO 88/01649 y las patentes de EEUU n° 4.946. 778 y 5.260.203.

Un “diacuerpo” es un pequeño fragmento de anticuerpo con dos sitios de unión al antígeno. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L o V_L-V_H). Utilizando un conector que sea demasiado corto como para permitir un apareamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena, los dominios son obligados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y se crean dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más a fondo, por ejemplo, en el documento EP 404.097; el documento WO 93/11161; y en Holliger *et al.* (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448.

Un “fragmento de dominio de anticuerpo” es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que contiene sólo la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En algunos casos,

dos o más regiones V_H están unidas covalentemente con un conector peptídico para crear un fragmento de dominio de anticuerpo bivalente. Las dos regiones V_H de un fragmento de dominio de anticuerpo bivalente pueden dirigirse a los mismos antígenos o a antígenos diferentes.

Una enfermedad inflamatoria autoinmunológicamente mediada (AOID) significa cualquier enfermedad o trastorno en que (a) la inflamación está presente en cualquier parte del ojo o los tejidos circundantes (incluyendo el nervio óptico, los vasos sanguíneos, los músculos), y (b) la inflamación es parte de una respuesta inmunológica que requiere o es estimulada por uno o ambos de IL-23 e IL-17. Una inflamación intraocular sin una etiología infecciosa se considera de forma típica una AOID. Los ejemplos no limitantes de AOID se listan a continuación.

Retinocorioidopatía de perdigonada (BSRC): es una enfermedad inflamatoria intraocular crónica que afecta principalmente la parte trasera (posterior) del ojo. La BSRC se diferencia de otras formas de uveitis posterior porque presenta una fuerte asociación con el antígeno HLA-A29.2. Su etiología sigue siendo desconocida. Es probable que un mecanismo autoinmunológico desempeñe un importante papel patológico.

Penfigoide cicatricial ocular (OCP): es una enfermedad autoinmunológica sistémica. Cada vez existen más pruebas que apoyan el concepto de una disfunción inmunorreguladora: los anticuerpos se dirigen contra la zona de la membrana basal (BMZ) de la conjuntiva y de otras membranas mucosas derivadas del epitelio escamoso estratificado y, a veces, de la piel. El OCP es una enfermedad que amenaza la visión y que normalmente requiere un tratamiento con inmunosupresión.

Queratitis, queratitis ulcerosa periférica: la queratitis es la inflamación del córne, la estructura en forma de cúpula, externa y transparente que forma la parte más anterior de la envuelta externa del ojo. Si una úlcera se desarrolla en la córne periférica se denomina queratitis ulcerosa periférica.

La “oftalmia simpática” es una AOID en que un traumatismo en un ojo provoca, en un momento posterior del tiempo, una inflamación destructiva en el otro ojo (“simpatiza”), aparentemente debido a una respuesta autoinmunológica frente a antígenos liberados del ojo lesionado.

Síndrome de Vogt-Koyanagi Harada (VKH): el síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), conocido anteriormente como síndrome uveomeningítico, es un trastorno sistémico que implica a múltiples sistemas de órganos, incluyendo los sistemas ocular, auditivo, nervioso e integumentario (piel). La panuveitis bilateral grave asociada con la acumulación de fluido subretiniano es una característica del VKH ocular.

Iridociclitis heterocrómica de Fuchs: es una uveitis anterior unilateral crónica que se caracteriza por una heterocromía del iris, un trastorno en que un ojo es de diferente color que el otro. La uveitis normalmente se produce en el ojo de color más claro de un adulto joven.

Un “compuesto de unión” se refiere a una molécula, una molécula pequeña, una macromolécula, un anticuerpo, un fragmento o análogo de éste, o un receptor soluble capaz de unirse a una diana especificada. Un “compuesto de unión” también puede referirse a uno cualquiera de los siguientes que sea capaz de unirse a la diana especificada: un complejo de moléculas (por ejemplo, un complejo molecular no covalente); una molécula ionizada; y una molécula covalente o no covalentemente modificada (por ejemplo, modificada mediante fosforilación, acilación, entrecruzamiento, ciclación o ruptura limitada). En los casos en que el compuesto de unión pueda disolverse o suspenderse en disolución, la “unión” puede definirse como una asociación del compuesto de unión con una diana en que la asociación produce como resultado una reducción en el movimiento browniano normal del compuesto de unión.

Una “composición de unión” se refiere a un compuesto de unión en combinación con al menos otra sustancia, como un estabilizante, un excipiente, una sal, un tampón, un disolvente o un aditivo.

Un “anticuerpo bis-específico” significa un anticuerpo que tiene dos sitios de unión al antígeno que tiene especificidades por dos epitopos diferentes, que pueden estar sobre el mismo antígeno o sobre dos antígenos diferentes. Los anticuerpos bis-específicos incluyen los fragmentos de anticuerpos bis-específicos. Véase, por ejemplo, Hollinger, *et al.* (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90:6444-6448; Gruber, *et al.*, J. Immunol., 152:5368 (1994).

“Consiste esencialmente en” y las variaciones, como “que consiste esencialmente en”, tal como se emplean en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, indican la inclusión de cualquier elemento o grupo de elementos mencionados, y la inclusión opcional de otros elementos de naturaleza similar o diferente a los elementos mencionados, que no cambian materialmente las propiedades básicas o nuevas del régimen de dosificación, el método o la composición especificados. Como ejemplo no limitante, una citoquina que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos mencionada también puede incluir uno o más aminoácidos que no afecten materialmente las propiedades de la citoquina.

Una “interleuquina-12R beta1” o “IL12RB1” significa una única cadena polipeptídica que consiste en la secuencia de la forma madura de la IL12RB1 humana, como se describe en la base de datos de secuencias de proteínas NCBI nº de registro NP714912, NP005526 o sus variantes que aparecen en la naturaleza.

Una “interleuquina-17” (o “IL-17”) significa una proteína que consiste en una o dos cadenas polipeptídicas, en que cada cadena consiste esencialmente en la secuencia de la forma madura de la IL17A humana, como se describe en la base de datos de secuencias de proteínas NCBI n° de registro NP002181, AAH67505, AAH67503, AAH67504, AAH66251, AAH66252 o sus variantes que aparecen en la naturaleza.

Una “IL-17R” o “IL-17RA” significa una única cadena polipéptidica que consiste esencialmente en la secuencia de la forma madura de la IL-17RA humana, según se describe en el documento WO 96/29408 o en cualquiera de los números de registro de la base de datos de secuencias de proteínas NCBI NP 055154, Q96F46, y CAJ86450, o sus variantes que aparecen en la naturaleza.

Una “IL-17RC” significa una única cadena polipéptidica que consiste esencialmente en la secuencia de la forma madura de la IL-17RC humana, según se describe en el documento WO 238764A2 o en cualquiera de los números de registro de la base de datos de secuencias de proteínas NCBI NP703191, NP703190 y NP116121, o sus variantes que aparecen en la naturaleza.

Una “interleuquina-23” (o “IL-23”) significa una proteína que consiste en dos cadenas polipeptídicas. Una cadena consiste esencialmente en la secuencia de la forma madura de la IL23 humana, subunidad p19 (también conocida como IL23A), según se describe en cualquiera de los números de registro de la base de datos de secuencias de proteínas NCBI NP057668, AAH67511, AAH66267, AAH66268, AAH66269, AAH667512, AAH67513 o sus variantes que aparecen en la naturaleza. La otra cadena consiste esencialmente en la secuencia de la forma madura de la IL12 humana, subunidad p40 (también conocida como IL12B y IL23, subunidad p40), según se describe en cualquiera de los números de registro de la base de datos de secuencias de proteínas NCBI NP002178, P29460, AAG32620, AAH74723, AAH67502, AAH67499, AAH67498, AAH67501 o sus variantes que aparecen en la naturaleza.

Una “interleuquina-23R” o “IL-23R” significa una única cadena polipeptídica que consiste en la secuencia de la forma madura de la IL23R humana, como se describe en la base de datos de secuencias de proteínas NCBI n° de registro NP653302 o sus variantes que aparecen en la naturaleza.

Un “anticuerpo monoclonal” o “mAb” significa un anticuerpo que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe considerarse que requiera la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular.

Una “administración parenteral” significa una inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular.

Una “molécula pequeña” significa una molécula con un peso molecular menor que 10 kD, de forma típica menor que 2 kD, y preferiblemente menor que 1 kD. Las moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas, moléculas orgánicas que contienen un componente inorgánico, moléculas que comprenden un átomo radiactivo, moléculas sintéticas, peptidomiméticos y miméticos de anticuerpos. Los peptidomiméticos de anticuerpos y citoquinas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Casset, *et al.* (2003), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307:198-205; Muyldermans (2001), *J. Biotechnol.*, 74:277-302; Li (2000), *Nat. Biotechnol.*, 18:1251-1256; Apostolopoulos, *et al.* (2002), *Curr. Med. Chem.*, 9:411-420; Monfardini, *et al.* (2002), *Curr. Pharm. Des.*, 8:2185-2199; Domingues, *et al.* (1999), *Nat. Struct. Biol.*, 6:652-656; Sato y Sone (2003), *Biochem. J.*, 371:603-608; patente de EEUU n° 6.326.482, otorgada a Stewart, *et al.*

“Específico” o “específicamente”, cuando hacen referencia a la interacción de unión entre los miembros de un par de unión, como una citoquina y su receptor, y un anticuerpo y su antígeno o epítopo, indican una reacción de unión que es determinativa de la presencia de un miembro de la pareja de unión en una población heterogénea de proteínas y otras biológicas. Así, bajo condiciones designadas, un miembro de una pareja de unión tiene una afinidad significativamente mayor por el otro miembro de la pareja de unión que por proteínas irrelevantes. Por ejemplo, un anticuerpo se considera específico por una proteína específica si se une a esa proteína con una afinidad que es al menos 10 veces mayor, y preferiblemente 50 veces mayor que su afinidad por una proteína diferente. Un anticuerpo que se “une específicamente” a una proteína que comprende un epítopo particular no se une en ningún grado mensurable a proteínas que no comprendan ese epítopo. Preferiblemente, un anticuerpo que es específico para una proteína diana tendrá una afinidad hacia la proteína diana que es mayor que aproximadamente 10⁹ litros/mol, según se determina, por ejemplo, mediante un análisis de Scatchard (Munsen, *et al.* (1980), *Analyt. Biochem.*, 107:220-239).

“Tratar” significa administrar un agente terapéutico, como una composición que contenga uno cualquiera de los antagonistas de IL-17 e IL-23 descritos en la presente, de forma interna o externa a un paciente que necesite el agente terapéutico. De forma típica, el agente se administra en una cantidad eficaz para prevenir o aliviar uno o más síntomas de enfermedad, o uno o más efectos adversos del tratamiento con un agente terapéutico diferente, evitando el desarrollo, induciendo la regresión o inhibiendo el avance de dicho síntoma o síntomas o dicho efecto o efectos adversos en cualquier grado clínicamente mensurable. La cantidad de agente terapéutico que es eficaz para aliviar cualquier síntoma de enfermedad o efecto adverso particulares (también conocida como “cantidad terapéuticamente eficaz”) puede variar según factores como el estado de la enfermedad, la edad y el peso del paciente, y la capacidad del agente terapéutico para producir una respuesta deseada en el paciente. Se puede evaluar si el síntoma de enfermedad o el efecto adverso se ha aliviado mediante cualquier medición clínica que los médicos u otros profesionales sanitarios utilizando de forma típica para evaluar la gravedad o estado del avance de ese síntoma o efecto adverso. Cuando un agente terapéutico se administra a un paciente que presente una enfermedad activa, una cantidad terapéuticamente

eficaz producirá, de forma típica, una reducción del síntoma medida en al menos 5%, normalmente en al menos 10%, más habitualmente en al menos 20%, lo más habitualmente en al menos 30%, preferiblemente en al menos 40%, más preferiblemente en al menos 50%, lo más preferiblemente en al menos 60%, idealmente en al menos 70%, más idealmente en al menos 80%, y lo más idealmente en al menos 90%. Aunque una realización de la presente invención (por ejemplo, un método de tratamiento o artículo manufacturado) pueda no ser eficaz para prevenir o aliviar el síntoma o síntomas o el efecto o efectos adversos de la enfermedad diana en todos los pacientes, debería aliviar dicho síntoma o síntomas o dicho efecto o efectos en un número estadísticamente significativo de pacientes, según se determina mediante cualquier ensayo estadístico conocido en la técnica, como el ensayo de la *t* de Student, el ensayo de la χ^2 , el ensayo de la *U* de Mann y Whitney, el ensayo de Kruskal-Wallis (ensayo de la *H*), el ensayo de Jonckheere-Terpstra y el ensayo de Wilcoxon.

Una uveitis significa una inflamación que afecta a una o más de las tres partes del ojo que forman la úvea: el iris (la parte coloreada del ojo), el cuerpo ciliar (detrás del iris, responsable de fabricar el fluido dentro del ojo) y la coroides (el tejido de revestimiento vascular bajo la retina). Una panuveitis indica la presencia de inflamación en múltiples partes del mismo ojo (secciones anterior, intermedia, y posterior).

La uveitis puede ser aguda o crónica. La forma crónica más a menudo se asocia con trastornos sistémicos, que incluyen la espondilitis anquilosante, el síndrome de Behçet, la enfermedad del intestino inflamatoria, la artritis reumatoide juvenil, el síndrome de Reiter, la sarcoidosis, la sífilis, la tuberculosis, y la enfermedad de Lyme.

La uveitis anterior, que implica una inflamación en la parte anterior del ojo, es la forma más habitual de uveitis. La inflamación normalmente está aislada al iris; por tanto, la uveitis anterior a menudo se denomina iritis. En algunos pacientes, la uveitis anterior puede estar asociada a la presencia de una enfermedad autoinmunitaria, como la artritis reumatoide o la espondilitis anquilosante, pero la mayoría de los casos de uveitis anterior se producen en personas que por lo demás están sanas y no indica una enfermedad sistémica subyacente. Esta OID puede afectar sólo a un ojo y es más habitual en personas jóvenes y de mediana edad. Una historia de una enfermedad autoinmunitaria es un factor de riesgo. La mayoría de los ataques de uveitis anterior duran de unos pocos días a semanas con tratamiento, pero las recaídas son habituales.

La uveitis intermedia indica un síndrome idiopático inflamatorio que implica principalmente el humor vítreo anterior, la retina periférica y el cuerpo ciliar, con signos inflamatorios mínimos o ausentes en el segmento anterior o coriorretiniano.

La pars planitis es la inflamación de la pars plana, una estrecha área entre el iris y la coroides. La pars planitis normalmente aparece en hombres jóvenes y en general no está asociada con ninguna otra enfermedad. Sin embargo, se ha informado acerca de unos pocos casos de asociación con la enfermedad de Crohn y algunos expertos sugieren una posible asociación con la esclerosis múltiple. Por esta razón, estos expertos recomiendan que los pacientes mayores de 25 años diagnosticados con pars planitis reciban una MRI del cerebro y de la columna.

La uveitis posterior afecta a la porción trasera del tracto uveal e implica principalmente a la coroides. Esto se denomina coroiditis. La uveitis posterior se caracteriza por una inflamación de la capa de vasos sanguíneos subyacente a la retina, y normalmente también está implicada la retina. Si también está implicada la retina adyacente, el trastorno se denomina de forma típica coriorretinitis. La uveitis posterior puede aparecer tras una infección sistémica o puede producirse en asociación con una enfermedad autoinmunitaria. En la uveitis posterior, la inflamación puede durar de meses a años y puede provocar daños en la visión permanentes, incluso con tratamiento.

II. General

La presente invención proporciona antagonistas de la actividad IL-17 e IL-23 para su uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria ocular autoinmunitaria.

La actividad IL17, analizada en Kolls, J. *et al.* (2004), *Immunity*, vol. 21, 467-476, incluye estimular la acumulación de neutrófilos en un área localizada y la activación de neutrófilos. La IL17 puede inducir o estimular la producción de una cualquiera de las siguientes citoquinas proinflamatorias y movilizantes de neutrófilos, dependiendo del tipo celular: IL-6, MCP-1, CXCL8 (IL-8), CXCL1, CXCL6, TNF α , IL-1 β , G-CSF, GM-CSF, MMP-1, y MMP-13.

La actividad IL-23 incluye inducir la proliferación de células T de memoria, PHA-blastos, células T CD45RO, células T CD45RO; y potencia la producción de gamma-interferón (IFN γ) por PHA-blastos o células T CD45RO. Por contraste con IL-12, la IL-23 estimula preferentemente poblaciones de células T de memoria en oposición a poblaciones de células T sin estimular en el ser humano y en ratones. La IL-23 activa una serie de moléculas de señalización intracelulares, por ejemplo Jak2, Tyk2, Stat1, Stat2, Stat3, y Stat4. La IL-12 activa este mismo grupo de moléculas pero la respuesta de Stat4 a la IL-23 es relativamente débil, mientras que la respuesta de Stat4 a la IL-12 es fuerte (Oppmann, *et al.*, *supra*; Parham, *et al.* (2002), *J. Immunol.* 168:5699-5708). La IL-23 también se ha implicado en el mantenimiento y la proliferación de células productoras de IL-17, también conocidas como células Th₁₇ (véase, Cua y Kastelein (2006), *Nature Immunology*, 7:557-559).

Los antagonistas útiles en la presente invención incluyen un receptor soluble que comprende el dominio extracelular de un receptor funcional para IL-17 o IL-23. Pueden prepararse receptores solubles y utilizarse según métodos

convencionales (véase, por ejemplo, Jones, *et al.* (2002), *Biochim. Biophys. Acta*, 1592:251-263; Prudhomme, *et al.* (2001), *Expert Opinion Biol. Ther.*, 1:359-373; Fernandez-Botrán (1999), *Crit. Rev. Clin. Lab Sci.*, 36:165-224).

Los antagonistas de IL-17 preferidos para su uso en la presente invención son anticuerpos que se une específicamente e inhiben la actividad de uno cualquiera de IL-17, IL-17RA, IL-17RC, y un complejo heteromérico que comprende IL-17RA y IL-17RC. Más preferiblemente, la diana del antagonista de IL-17 es IL-17 o IL-17RA. Se prefieren particularmente los antagonistas de IL-17 para que se unan e inhiban la actividad de IL-17.

Otro antagonista de IL-17 preferido para su uso en la presente invención es un anticuerpo biespecífico, o un fragmento de un anticuerpo biespecífico, que también antagonice la actividad IL-23. Estos antagonistas biespecíficos se unen específicamente e inhiben la actividad de cada miembro en una cualquiera de las siguientes combinaciones: IL-17 e IL-23; IL-17 e IL-23p19; IL-17 e IL-12p40; IL-17 y un complejo de IL-23R/IL12RB1; IL-17 e IL-23R; IL-17 e IL12RB1; IL17RA e IL-23; IL-17RA e IL-23p19; IL-17RA e IL-12p40; IL-17RA y un complejo de IL-23R/IL12RB1; IL-17RA e IL-23R; IL-17RA e IL12RB1; IL17RC e IL-23; IL-17RC e IL-23p19; IL-17RC e IL-12p40; IL-17RC y un complejo de IL-23R/IL12RB1; IL-17RC e IL-23R; IL-17RC e IL12RB1; un complejo de IL-17RA/IL-17RC e IL-23; un complejo de IL-17RA/IL-17RC e IL-23p19; un complejo de IL-17RA/IL-17RC e IL-12p40; un complejo de IL-17RA/IL-17RC y un complejo de IL-23R/IL12RB1; un complejo de IL-17RA/IL-17RC e IL-23R; y un complejo de IL-17RA/IL-17RC e IL12RB1. Las combinaciones preferidas a las que se dirigen los anticuerpos biespecíficos utilizados en la presente invención son: IL-17 e IL-23; IL-17 y IL-23p19; IL17RA e IL-23; y IL-17RA e IL-23p19. Un anticuerpo biespecífico particularmente preferido se une específicamente e inhibe la actividad de cada uno de IL-17 e IL-23p19.

Los antagonistas de IL-23 preferidos son anticuerpos que se unen e inhiben la actividad de uno cualquiera de IL-23, IL-23p19, IL-12p40, IL23R, IL12RB1, y un complejo de IL-23R/IL12RB1. Otro antagonista de IL-23 preferido es un polipéptido de unión a IL-23 que consiste esencialmente en el dominio extracelular de IL-23R, por ejemplo los aminoácidos 1-353 de GenBankAAM44229, o sus fragmentos.

Los antagonistas de anticuerpos para su uso en la invención pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica para preparar anticuerpos. La preparación de anticuerpos monoclonales, policlonales y humanizados se describe en Sheperd y Dean (eds.) (2000), *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, Nueva York, NY; Kontermann y Dubel (eds.) (2001), *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, Nueva York; Harlow y Lane (1988), *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 139-243; Carpenter, *et al.* (2000), *J. Immunol.*, 165:6205; He, *et al.* (1998), *J. Immunol.*, 160:1029; Tang, *et al.* (1999), *J. Biol. Chem.*, 274:27371-27378; Baca, *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.*, 272:10678-10684; Chothia, *et al.* (1989), *Nature*, 342:877-883; Foote y Winter (1992), *J. Mol. Biol.*, 224:487-499; y la patente de EEUU nº 6.329.511, otorgada a Vasquez, *et al.*

Puede utilizarse cualquier forma antigénica de la diana deseada para generar anticuerpos, que pueden seleccionarse para determinar cuáles tienen la actividad antagonizante deseada. Por tanto, el antígeno suscitador puede ser un péptido que contenga un único epitopo o múltiples epitopos, o puede ser la proteína completa por sí sola o en combinación con uno o más agentes potenciadores de la inmunogenicidad conocidos en la técnica. Para mejorar la inmunogenicidad de un péptido antigénico, el péptido puede conjugarse con una proteína portadora. El antígeno también puede ser una proteína de longitud completa aislada, una proteína de la superficie celular (por ejemplo, inmunizando con células transfectadas con al menos una porción del antígeno), o una proteína soluble (por ejemplo, inmunizando sólo con la porción del dominio extracelular de la proteína). El antígeno puede ser expresado por una célula genéticamente modificada, en que el ADN que codifica el antígeno es genómico o no genómico (por ejemplo, sobre un plásmido).

Un péptido que consiste esencialmente en una región con una alta antigenicidad predicha puede utilizarse para la generación de anticuerpos. Por ejemplo, aparecen regiones de alta antigenicidad de p19 humano en los aminoácidos 16-28; 57-87; 110-114; 136-154; y 182-186 de GenBank AAQ89442 (gi: 37183284), aparecen regiones de alta antigenicidad de la IL-23R humana en los aminoácidos 22-33; 57-63; 68-74; 101-112; 117-133; 164-177; 244-264; 294-302; 315-326; 347-354; 444-473; 510-530; y 554-558 de f GenBank AAM44229 (gi: 21239252), según se determina mediante un análisis con una gráfica Parker utilizando Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD).

Puede emplearse cualquier método adecuado de inmunización. Estos métodos pueden incluir el uso de adyuvantes, otros inmunoestimulantes, inmunizaciones de refuerzo repetidas, y el uso de una o más vías de inmunización. La inmunización también puede realizarse mediante una inmunización con vector de ADN, véase, por ejemplo, Wang, *et al.* (1997), *Virology*, 228:278-284. Como alternativa, los animales pueden inmunizarse con células que portan el antígeno de interés, que puede proporcionar una mayor generación de anticuerpos que una inmunización con el antígeno purificado (Kaithamana, *et al.* (1999), *J. Immunol.*, 163:5157-5164).

Los antagonistas de anticuerpos preferidos son los anticuerpos monoclonales, que pueden obtenerse mediante una diversidad de técnicas familiares para los expertos en la técnica. Los métodos para generar anticuerpos monoclonales se describen en general en Stites, *et al.* (eds.), *BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY* (4ª ed.), Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y las referencias citadas en ello; Harlow y Lane (1988), *Antibodies: A LABORATORY MANUAL* CSH Press; Goding (1986), *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE* (2ª ed.), Academic Press, Nueva York, NY. De forma típica, esplenocitos aislados a partir de un hospedante mamífero inmunizado se inmortalizan, de forma habitual mediante una fusión con una célula de mieloma para producir un hibridoma. Véase Kohler y Milstein (1976), *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519; Meyaard, *et al.* (1997), *Immunity*, 7:283-290; Wright,

et al. (2000), *Immunity*, 13:233-242; Preston, *et al.* (1997), *Eur. J. Immunol.*, 27:1911-1918. Los métodos alternativos de immortalización incluyen la transformación con el virus de Epstein Barr, oncogenes, o retrovirus; u otros métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Doyle, *et al.* (eds. 1994 y suplementos periódicos), *CELL AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES*, John Wiley and Sons, Nueva York, NY. Las colonias que surgen de células immortalizadas individuales se seleccionan para la producción de anticuerpos con la especificidad, la afinidad y la actividad de inhibición deseadas utilizando ensayos de unión y biológicos adecuados. Por ejemplo, pueden medirse las propiedades de unión del anticuerpo a la diana, por ejemplo, mediante resonancia de plasmones de superficie (Karlsson, *et al.* (1991), *J. Immunol. Methods*, 145:229-240; Neri, *et al.* (1997), *Nat. Biotechnol.*, 15:1271-1275; Jons-son, *et al.* (1991), *Biotechniques*, 11:620-627) o mediante ELISA de competición (Friguet, *et al.* (1985), *J. Immunol. Methods*, 77:305-319; Hubble (1997), *Immunol. Today*, 18:305-306).

Como alternativa, se pueden aislar secuencias de ADN que codifiquen un anticuerpo monoclonal, o su fragmento de unión, mediante la selección de un banco de ADN para detectar células B humanas (véase, por ejemplo, Huse, *et al.* (1989), *Science*, 246:1275-1281). Otras técnicas adecuadas implican la selección de bancos de presentación de anticuerpos de fagos. Véase, por ejemplo, Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989); y Ward *et al.*, *Nature*, 341:544-546 (1989); Clackson *et al.* (1991), *Nature*, 352:624-628, y Marks *et al.* (1991), *J. Mol. Biol.*, 222:581-597; Presta (2005), *J. Allergy Clin Immunol.*, 116:731.

Los anticuerpos monoclonales preferidos para su uso en la presente invención son anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en que el dominio variable procede del anticuerpo de origen generado en un animal mamífero experimental, como una rata o un ratón, y los dominios constantes se obtienen a partir de un anticuerpo humano, de forma que será menos probable que el anticuerpo quimérico resultante provoque una respuesta inmunológica adversa en un sujeto humano que el anticuerpo de mamífero de origen. Más preferiblemente, un anticuerpo monoclonal utilizado en la presente invención es un “anticuerpo humanizado”, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables (por ejemplo, las regiones determinantes de la complementariedad o CDR) en los dominios variables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones de marco (FR) en los dominios variables son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo monoclonal particularmente preferido para su uso en la presente invención es un “anticuerpo totalmente humano”, por ejemplo, un anticuerpo que comprenda sólo secuencias de proteínas de inmunoglobulinas humanas. Un anticuerpo totalmente humano puede contener cadenas de carbohidratos procedentes de la especie de célula en que se produce, por ejemplo si se produce en un ratón, en una célula de ratón o en un hibridoma derivado de una célula de ratón, un anticuerpo totalmente humano contendrá, de forma típica, cadenas de carbohidratos murinas.

Los anticuerpos monoclonales utilizados en la presente invención también pueden incluir anticuerpos de dominio único camelizados. Véase, por ejemplo, Muyldermans *et al.* (2001), *Trends Biochem. Sci.*, 26:230; Reichmann *et al.* (1999), *J. Immunol. Methods*, 231:25; documento WO 94/04678; documento WO 94/25591; y patente de EEUU nº 6.005.079.

Los anticuerpos antagonistas utilizados en la presente invención pueden tener regiones Fc modificadas (o bloqueadas) para proporcionar unas funciones efectoras alteradas. Véase, por ejemplo, la patente de EEUU nº 5.624.821; el documento WO2003/086310; el documento WO2005/120571; y el documento WO2006/0057702. Las alteraciones de la región Fc incluyen cambios en aminoácidos (sustituciones, delecciones e inserciones), glicosilación o desglicosilación, y adición de múltiples Fc. Los cambios en Fc pueden alterar la semivida de los anticuerpos terapéuticos, permitiendo una dosificación menos frecuente y, por tanto, aumentando la comodidad y disminuyendo el uso de materiales. Véase, Presta (2005), *J. Allergy Clin. Immunol.*, 116:731 en 734-735.

Los anticuerpos también pueden conjugarse (por ejemplo, unirse covalentemente) a moléculas que mejoran la estabilidad del anticuerpo durante la conservación o que aumentan la semivida del anticuerpo *in vivo*. Los ejemplos de moléculas que aumentan la semivida son la albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humana) y el polietilenglicol (PEG). Pueden prepararse derivados de anticuerpos unidos a albúmina y PEGilados utilizando técnicas muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Chapman, A.P. (2002), *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54:531-545; Anderson y Tomasi (1988), *J. Immunol. Methods*, 109:37-42; Suzuki, *et al.* (1984), *Biochim. Biophys. Acta*, 788:248-255; y Brekke y Sandlie (2003), *Nature Rev.*, 2:52-62).

Pueden producirse anticuerpos biespecíficos que antagonicen ambas actividades IL-17 y IL-23 mediante cualquier técnica conocida en la técnica. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos biespecíficos de forma recombinante utilizando la coexpresión de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulinas. Véase, por ejemplo, Milstein *et al.* (1983), *Nature*, 305:537-539. Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Véase, por ejemplo, Brennan, *et al.* (1985), *Science*, 229:81. Estos anticuerpos bifuncionales también pueden prepararse mediante intercambio de disulfuro, producción de híbridos-hibrodomas (cuadromas), mediante transcripción y traducción para producir una única cadena polipeptídica incluida en un anticuerpo biespecífico, o mediante transcripción y traducción para producir más de una cadena polipeptídica que puede asociarse covalentemente para producir un anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico contemplado también puede fabricarse totalmente mediante síntesis química. El anticuerpo biespecífico puede comprender dos regiones variables diferentes, dos regiones constantes diferentes, una región variable y una región constante, u otras variaciones.

Los anticuerpos utilizados en la presente invención normalmente se unen con al menos una K_D de aproximadamente 10^{-3} M, más habitualmente al menos 10^{-6} M, de forma típica al menos 10^{-7} M, de forma más típica al menos 10^{-8} M,

preferiblemente al menos aproximadamente 10^{-9} M, y más preferiblemente al menos 10^{-10} M, y lo más preferiblemente al menos 10^{-11} M (véase, por ejemplo, Presta, *et al.* (2001), *Thromb. Haemost.*, 85:379-389; Yang, *et al.* (2001), *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 38:17-23; Carnahan, *et al.* (2003), *Clin. Cancer Res.* (supl.), 9:3982s-3990s).

Los antagonistas de IL-17 y los antagonistas de IL-23 se administran a un paciente de forma típica como una composición farmacéutica en que el antagonista se mezcla con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable; véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, y U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). La composición farmacéutica puede formularse de cualquier manera adecuada para la vía de administración prevista. Los ejemplos de formulaciones farmacéuticas incluyen polvos liofilizados, suspensiones espesas, disoluciones acuosas, suspensiones y formulaciones de liberación sostenida (véase, por ejemplo, Hardman, *et al.* (2001), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, NY; Gennaro (2000), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, Nueva York, NY; Avis, *et al.* (eds.) (1993), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000), Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY).

La vía de administración dependerá de las propiedades del antagonista u otro agente terapéutico utilizado en la composición farmacéutica. Una posible vía de administración es administrar la composición farmacéutica por vía tópica al ojo en forma de un ungüento, gel o gotas utilizando un sistema de administración ocular conocido en la técnica, como un aplicador o un cuentagotas. Como alternativa, la composición farmacéutica puede administrarse por vía intraocular mediante un implante polimérico que se coloca bajo la conjuntiva del ojo, o a través de una inyección directa al ojo. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas que contienen antagonistas de IL-17 y antagonistas de IL-23 se administran por vía sistémica mediante ingestión oral, inyección o infusión mediante la vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intracerebroespinal, intralesional, o pulmonar, o mediante sistemas de liberación sostenida, como implantes. La inyección de vectores de transferencia de genes al sistema nervioso central también se ha descrito (véase, por ejemplo, Cua, *et al.* (2001), *J. Immunol.*, 166:602-608; Sidman *et al.* (1983), *Biopolymers*, 22:547-556; Langer, *et al.* (1981), *J. Biomed Mater. Res.*, 15:167-277; Langer (1982), *Chem. Tech.*, 12:98-105; Epstein, *et al.* (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-3692; Hwang, *et al.* (1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030-4034; patentes de EEUU nº 6.350.466 y 6.316.024).

Las composiciones farmacéuticas utilizadas en la invención pueden administrarse según cualquier régimen de tratamiento que mejore o evite uno o más síntomas de la AOID. La selección del régimen de tratamiento dependerá de varios factores dependientes de la composición y dependientes del paciente que incluyen, pero no se limitan a la semivida del antagonista, la gravedad de los síntomas del paciente, y el tipo o duración de cualquier efecto secundario. Preferiblemente, un régimen de administración maximiza la cantidad de agente terapéutico administrado al paciente que sea coherente con un nivel aceptable de efectos secundarios. Están disponibles líneas generales para seleccionar las dosis apropiadas de anticuerpos y moléculas pequeñas terapéuticas (véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996), *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, Reino Unido; Kresina (ed.) (1991), *Monoclonal Antibodies*, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Bach (ed) (1993), *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, Nueva York, NY; Baert, *et al.* (2003), *New Engl. J. Med.*, 348:601-608; Milgrom, *et al.* (1999), *New Engl. J. Med.*, 341:1966-1973; Slamon, *et al.* (2001), *New Engl. J. Med.*, 344:783-792; Beniaminovitz, *et al.* (2000), *New Engl. J. Med.*, 342:613-619; Ghosh, *et al.* (2003), *New Engl. J. Med.*, 348:24-32; Lipsky, *et al.* (2000), *New Engl. J. Med.*, 343:1594-1602).

Los antagonistas biológicos, como los anticuerpos, pueden proporcionarse mediante infusión continua, o en dosis a intervalos, por ejemplo, de una vez diaria, una vez semanal, o de 2 a 7 veces semanales, una vez en semanas alternas, o una vez mensual. Una dosis total semanal de un anticuerpo es, en general, de al menos 0,05 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal, más en general de al menos 0,2 $\mu\text{g/kg}$, lo más general de al menos 0,5 $\mu\text{g/kg}$, de forma típica de al menos 1 $\mu\text{g/kg}$, de forma más típica de al menos 10 $\mu\text{g/kg}$, de la forma más típica de al menos 100 $\mu\text{g/kg}$, preferiblemente de al menos 0,2 mg/kg, más preferiblemente de al menos 1,0 mg/kg, lo más preferiblemente de al menos 2,0 mg/kg, de forma óptima de al menos 10 mg/kg, de forma más óptima de al menos 25 mg/kg, y de la forma más óptima de al menos 50 mg/kg (véase, por ejemplo, Yang, *et al.* (2003), *New Engl. J. Med.*, 349:427-434; Herold, *et al.* (2002), *New Engl. J. Med.*, 346:1692-1698; Liu, *et al.* (1999), *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, 67:451-456; Portielji, *et al.* (20003), *Cancer Immunol. Immunother.*, 52:133-144). La dosis deseada de una molécula pequeña terapéutica, por ejemplo, un peptidomimético, un producto natural, o un producto químico orgánico, es aproximadamente la misma que para un anticuerpo o un polipéptido, en una base de moles/kg. La determinación de la dosis apropiada la realiza un médico, por ejemplo utilizando parámetros o factores conocidos o sospechosos en la técnica por afectar al tratamiento o que pueda predecirse que afecten al tratamiento. En general, la primera dosis es algo menor que la dosis óptima, y la dosis se va aumentando en pequeños incrementos después hasta que se logre el efecto deseado u óptimo con relación a cualquier efecto secundario negativo.

Los regímenes de tratamiento que emplean antagonistas de IL-17 o IL-23 serán determinados, de forma típica, por el médico encargado y tomarán en cuenta la edad del paciente, la historia médica, los síntomas de la enfermedad, y la tolerancia por diferentes tipos de medicaciones y regímenes de dosificación. En general, el régimen de tratamiento se diseña para suprimir el sistema inmunológico excesivamente agresivo, permitiendo que el cuerpo finalmente se autorregule, y el resultado a menudo es que, después de que el paciente se haya mantenido con medicaciones sistémicas para suprimir la respuesta inmunológica inapropiada durante una duración finita de tiempo (por ejemplo, un año),

entonces pueda disminuirse y detenerse la medicación sin recaídas del ataque autoinmunitario. A veces sí se produce el ataque, en cuyo caso el paciente debe volver a tratarse.

Así, en algunos casos, el médico puede prescribir al paciente un cierto número de dosis del antagonistas para tomarlas a lo largo de un periodo de tiempo prescrito, tras el cual se detiene la terapia con el antagonista. Preferiblemente, después de un periodo de tratamiento inicial en que desaparecen uno o más de los síntomas agudos de la enfermedad, el médico continuará la terapia agonista durante algún tiempo, en que la cantidad y/o la frecuencia del antagonista administrado se reduce gradualmente antes de detener el tratamiento.

La presente invención también contempla regímenes de tratamiento en que un antagonista de IL-17 se utiliza en combinación con un antagonista de IL-23. Estos regímenes pueden ser especialmente útiles para tratar la fase aguda de una AOID, en que el antagonista de IL-17 inhibe la actividad de las células Th₁₇ existentes, mientras que el antagonista de IL-23 evita la generación de nuevas células Th₁₇. Esta terapia de combinación puede proporcionar un tratamiento eficaz de una AOID utilizando una dosis menor del antagonista de IL-17 y/o administrando el antagonista de IL-17 durante un periodo de tiempo más corto. A medida que mejoran los síntomas, la terapia con el antagonista de IL-17 preferiblemente se detiene, mientras que la administración del antagonista de IL-23 continúa para evitar la generación de nuevas células Th₁₇ autorreactivas que podrían conducir a la recurrencia de la enfermedad. Los dos antagonistas pueden administrarse al mismo tiempo en una única composición, o en composiciones separadas.

Como alternativa, los dos antagonistas pueden administrarse en intervalos separados. También pueden utilizarse dosis diferentes de los antagonistas. De forma similar, un antagonista biespecífico también puede administrarse durante la fase aguda y retirarse de manera gradual, seguido de un tratamiento con un antagonista de IL-23 para mantener la represión de la enfermedad.

El régimen de tratamiento también puede incluir el uso de otros agentes terapéuticos, para mejorar uno o más síntomas de la AOID, o para prevenir o mejorar los efectos adversos de la terapia de antagonistas. Los ejemplos de agentes terapéuticos que se han empleado para tratar los síntomas de AOID son esteroides y otros agentes antiinflamatorios. Los ejemplos de estas terapias incluyen, pero no se limitan a esteroides, como dexametasona, flumetolona, y prednisolona, así como agentes antiinflamatorios no esteroideos, como indometacina, aspirina, flubiprofeno y diclofenaco, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, azatioprina), inhibidores de factores de transcripción (por ejemplo, ciclosporina, tacrolimus), y agentes entrecruzadores de ADN (por ejemplo, ciclofosfamida, clorambucilo). Se están empezando a utilizar nuevos agentes dirigidos contra citoquinas y sus receptores, muchos de los cuales actúan inhibiendo importantes citoquinas de Th1 en lugar de las vías de señalización, para el tratamiento de pacientes con uveítis. Estos incluyen inhibidores de TNF, como infliximab (Remicade®, Centocor, Malvern, PA), etanercept (Enbrel®, Amgen, Thousand Oaks, CA), y adalimumab (Humira®, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) e inhibidores específicos de la señalización de IL-2, incluyendo daclizumab (Zenapax®, Roche Laboratories, Nutley, NJ) y basiliximab (Simulect®, Novartis Pharmaceutical Co.; East Hanover, NJ).

En cualquiera de las terapias descritas en la presente en que se empleen dos o más sustancias terapéuticas diferentes (por ejemplo, un antagonista de IL-17 y un antagonista de IL-23, un antagonista de IL-17 y un agente terapéutico que no antagonice la actividad IL-17 o IL-23), se entenderá que las diferentes sustancias terapéuticas se administrarán en asociación entre sí, es decir, pueden administrarse al mismo tiempo en la misma composición farmacéutica, o como composiciones separadas, o las sustancias pueden administrarse en momentos diferentes, y en diferente orden.

El diagnóstico de la presencia de una AOID en un paciente implicará, de forma típica, examinar al paciente para detectar síntomas conocidos como coherentes con esta enfermedad. Por ejemplo, la presentación típica de la uveítis anterior implica dolor, fotofobia e hiperlagrimeo. El paciente menciona un dolor profundo y sordo en el ojo implicado y la órbita circundante. La sensibilidad a la luz asociada puede ser grave. Se produce un lagrimeo excesivo tras una mayor estimulación neural de la glándula lagrimal y el paciente no menciona una sensación de sentir un cuerpo extraño en el ojo. La agudeza visual es variable, desde una visión borrosa suave a una pérdida de visión significativa si están presentes sinequias o membranas cicloticas. Un examen puede revelar un hinchamiento del párpado de suave a moderado que produce pseudoptosis. Una inyección profunda y perilmbica de la conjuntiva y la episclerótica puede ser típica, aunque la conjuntiva palpebral es característicamente normal. La córnea puede mostrar un edema suave.

Las señales características de la uveítis anterior incluyen células y enrojecimiento en la cámara anterior. Si la reacción en la cámara anterior es significativa, pueden estar presentes pequeños depósitos endoteliales de gris a marrón conocidos como precipitados queráticos. Esto puede conducir entonces a una disfunción de las células endoteliales y a un edema corneal. Los resultados del iris pueden incluir adhesiones en la cápsula de la lente (sinequias posteriores) o, de forma menos habitual, en la córnea periférica (sinequias anteriores). Además pueden aparecer nódulos granulomatosos sobre la superficie del iris. La presión intraocular inicialmente se reduce en el ojo implicado debido a una hipotonía secretora del cuerpo ciliar. Sin embargo, a medida que la reacción persiste, los subproductos inflamatorios pueden acumularse en el trabeculum. Si estos desechos se acumulan significativamente, y si el cuerpo ciliar retoma su producción secretora normal, la IOP puede aumentar con rapidez, dando como resultado un glaucoma uveítico secundario.

La identificación de pacientes que son susceptibles de una AOID se realiza de forma típica tomando en cuenta la historia médica personal y familiar, y puede incluir un ensayo genético. Por ejemplo, algunos individuos tendrán una predisposición genética a la uveítis que está relacionada con procesos de enfermedad autoinmunitarios. El más

común de estos “genes” es el haplotipo HLA B27 que puede predisponer sólo a la uveitis o también a espondiloartropatías seronegativas y artropatías enteropáticas. Los ejemplos son espondilitis anquilosante, artritis reactiva (síndrome de Reiter), artritis psoriática, enfermedad del intestino irritable y enfermedad de Crohn. Un paciente también puede diagnosticarse como susceptible a una AOID si existe una historia familiar de cualquiera de estas enfermedades autoinmunitarias, o si el paciente ya se ha diagnosticado con dicha enfermedad.

La eficacia de la terapia antagonista para evitar o tratar una AOID en un paciente particular puede determinarse utilizando mediciones diagnósticas, como una reducción o aparición de síntomas inflamatorios, por ejemplo de la cantidad de inflamación ocular o del nivel de citoquinas inflamatorias en el ojo u ojos afectados. Los síntomas de la inflamación ocular dependen, en gran parte, del área afectada del ojo. Los signos y síntomas más habituales son: dolor, enrojecimiento, depósitos, disminución de la visión y sensibilidad a la luz. El nivel de citoquinas inflamatorias puede medirse, por ejemplo, poniendo en contacto un compuesto de unión para la citoquina inflamatoria de interés con una muestra procedente del ojo del paciente, así como con una muestra procedente de un sujeto control o procedente de un tejido o fluido no afectado del paciente, y después comparando los niveles de citoquinas detectados con el compuesto de unión. La expresión o la actividad de un sujeto control o de una muestra control puede proporcionarse como un valor predeterminado, por ejemplo adquirido a partir de un grupo estadísticamente apropiado de sujetos control.

Ejemplos

La presente invención se basa en estudios en ratones deficientes en IL-23p19 (IL-23p19 “knock-out” (KO)) y en la administración de anticuerpos anti-IL-23p19 y anti-IL-17 a modelos murinos de uveitis autoinmunitaria. Estos experimentos se realizaron según los materiales y métodos descritos en la sección II que aparece a continuación.

I. Resultados y análisis

En los experimentos utilizando ratones IL-23p19 KO, la susceptibilidad a la EAU de ratones IL-23p19 KO (deficientes en IL-23) se comparó con la susceptibilidad a la EAU de ratones IL-12p35 KO (deficientes en IL-12) y ratones IL-12p40 KO (deficientes en IL-12 e IL-23). Todos los ratones se basaban en C57BL/6, y la inducción y puntuación de la EAU se realizó como se describe en los métodos generales que aparecen a continuación. Se descubrió que no se requería IL-12p35 para la generación de destrucción de tejido ocular específica de IRBP. Por contraste, la IL-23p19 resulta fundamental para el desarrollo de la EAU (tabla 1). El análisis de las citoquinas de cultivos celulares de nódulo linfático derivados de ratones inmunizados con IRBP demostró que los ratones deficientes en IL-12 susceptibles a la EAU (IL-12p35KO) tenían unos niveles elevados de IFN- γ , IL-6, IL-17 e IL-18, comparados con los ratones deficientes en IL-23 (IL-23p19KO e IL-12p40KO). Unas respuestas de hipersensibilidad retrasadas (DTH) al IRBP en las tres razas KO, estudiadas mediante el ensayo del hinchamiento de la oreja, demostraron que la respuesta de DTH al IRBP se correlacionaba bien con las puntuaciones de la EAU de los respectivos ratones, produciendo unas respuestas significativamente menores en p19 y p40 KO y unas respuestas significativamente mayores en p35 KO comparado con el tipo salvaje (WT).

TABLA 1

La IL-23, pero no la IL-12, es fundamental para el desarrollo de la EAU

	EAU Puntuación media +/- EE	DTH Hinchamiento específico +/- EE ($\mu\text{m} \times 10^{-1}$)	IFN- γ (ng/ml)	IL-6 (ng/ml)	IL-17 (ng/ml)	IL-18 (ng/ml)
Tipo salvaje	0,21 \pm 0,11	44 \pm 7	39	3,2	2,2	0,25
IL-12p35KO	0,57 \pm 0,12	57 \pm 2	16	1,9	4,9	0,29
IL-23p19KO	0	25 \pm 4	6,5	0,55	1,2	0,10
IL-12p40KO	0	22 \pm 3	<1	0,08	0,85	0,11

Estos resultados también fueron apoyados por experimentos que emplean un anticuerpo anti-IL-23p19 de ratón en un modelo de ratón de la uveitis, en la raza B10.RIII muy susceptible. Se descubrió que el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-23p19 de ratón bloqueaba significativamente la inflamación ocular inmunológicamente mediada. A una dosis de 330 μ g por ratón en días alternos, el índice de enfermedad de la EAU de los ratones tratados con anti-IL-23p19 se redujo en gran medida, comparado con controles tratados con anticuerpos anti-isotipo y sin anticuerpos, según se determinó mediante histopatología de los ojos recogida en el día 11 después de la inmunización (tabla 2). Además, la terapia anti-IL-23p19 fue tan eficaz como la prednisona para bloquear la EAU. Los niveles de expresión de ARNm de IL-17, pero no de ARNm de IFN- γ , en los ojos de ratones tratados con anti-IL-23p19 fueron menores que en el grupo control, lo cual sugiere que cuando se fija como objetivo la IL-23 se inhibe la EAU bloqueando la infiltración de células productoras de IL-17 o evitando la expansión de células productoras de IL-17 patológicas dentro de los ojos. Los niveles de ARNm de mieloperoxidasa y elastasa de neutrófilos en ratones tratados con anti-IL-23p19 fueron comparable a los grupos sin estimular y a los grupos control tratados con prednisona, mientras que los ratones control no tratados con anticuerpos y tratados con anticuerpos de isotipo mostraron un aumento de 10 a 100 veces de la expresión de estos genes inflamatorios. Otros factores proinflamatorios, como IL-1 β , TNF, IL-6, NOS2 y COX2 aparecían ligeramente reducidos en los ratones tratados con anti-IL-23p19. Estos resultados demuestran que fijando como objetivo la IL-23 se inhibe el desarrollo de la uveitis autoinmunitaria.

TABLA 2

Un tratamiento con anti-IL-23p19 inhibe la EAU y la expresión de citoquinas inflamatorias en el ojo

	Histopatología 0 = normal 1 = poca infiltración de monocitos 4 = daños graves (ojos individuales)	Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa del ojo (mostrada como expresión con relación a la ubiquitina). Las muestras de tejido se recogieron en el día 11 después de la inmunización con IRBP.								
		IFN- γ	IL-6	IL-17	TNF	IL-1 β	NOS2	COX2	Elastasa de neutrófilos	Mieloper- oxidasa
Ratones sin estimular	0 0 0 0 0	0,44	0,16	0	0	3,8	2,7	4,8	0,1	0
Control sin mAb	4 4 4 4 4 3 3 3 2 2 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1	6,2	37,6	7,1	37,8	117,8	22,2	24,6	1,23	4,11
Control con mAb de isotipo	4 4 4 4 4 4 2 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0	NA	13,6	3,1	28,3	103,0	19,2	14,5	1,35	3,09
Anti-IL- 23p1	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0	6,9	10,3	0,013	12,5	64,3	14,7	8,9	0,08	0
Prednisona	4 4 2 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0	0,51	1,2	0	17,9	74,6	5,2	14,6	0,55	0

También se realizó otro grupo de experimentos que comparan el tratamiento con anticuerpos anti-IL-23p19 con el tratamiento con anticuerpos anti-IL-12p40. En este experimento, los ratones recibieron 500 μ g de los anticuerpos indicados en días alternos, comenzando el día antes de la inmunización, y los ojos y los órganos linfoides se recogieron 17 días después de la inmunización, o 6-7 días después de la aparición de la enfermedad en los controles. Los datos indican que los anticuerpos anti-IL-23p19 eran tan eficaces como los anticuerpos anti-p40 para bloquear la aparición de la uveitis. Los datos se muestran en la tabla 3.

ES 2 333 260 T3

Además, la expresión de proteínas de citoquinas en los nódulos linfáticos de estos ratones se evaluó mediante ELISA multiplex. Estos datos demuestran que el tratamiento con antagonistas de IL-23 disminuye la producción de Th1 y de citoquinas proinflamatorias. Los datos se muestran en la tabla 3.

TABLA 3

El tratamiento con anti-IL-23p19 inhibe la EUA y las respuestas de citoquinas sistémicas frente al antígeno de la uveitis

Muestra	Puntuación de EAU de los ojos individuales	IL-2 pg/ml	IL-4 pg/ml	IL-5 pg/ml	IL-6 pg/ml	IL-10 pg/ml	IFN- γ pg/ml	TNF- α pg/ml	IL-12 pg/ml	IL-17 pg/ml
Control	3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 0, 0,25	247,6	0,4	< 3,1	145,7	8,6	1295,3	46,5	2,7	72,9
Anti-IL-23p19	3, 3, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	115,0	1,3	19,1	163,7	5,5	1453,3	87,5	2,1	37,0
Anti-isotipo	3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3	205,2	1,4	< 3,1	206,7	12,4	2759,6	51,2	3,1	198,0
Anti-IL-12p40	0,25, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	101,9	0,4	< 3,1	26,5	4,4	305,5	16,6	< 0,8	29,7

Una segunda parte de este experimento examinó la etapa del proceso patogénico durante la cual se requiere IL-23. Se trataron ratones con 500 μ g de anticuerpo anti-IL-23 p19 en día alternos, comenzando 7 días después de la inmunización, y la enfermedad se comparó con ratones que fueron tratados desde el día antes de la inmunización (como antes). La EAU pudo prevenirse mediante un tratamiento temprano con anticuerpos anti-p19 o anti-p40. Sin embargo, cuando el tratamiento comienza 7 días después de la inmunización, un momento en que las células T efectoras uveitogénicas ya han sido cebadas y pueden aislarse de NL y bazo, el desarrollo de EAU no puede abortarse y las puntuaciones de enfermedad desarrolladas por los ratones tratados son similares a las de los controles. Esto sugiere que la necesidad de IL-23 se produce en una etapa temprana de la patogénesis de la enfermedad. Los datos se muestran en la tabla 4.

TABLA 4

Un tratamiento con anticuerpo anti-p19 evita, pero no revierte, la EAU

Comienzo del tratamiento	Anticuerpo	Puntuación de EAU \pm EE
día -1	Anti-isotipo	2,9 \pm 0,1
	Anti-P19	0,6 \pm 0,6
	Anti-P40	0 \pm 0
día 7	Anti-isotipo	2,05 \pm 0,5
	Anti-P19	2,35 \pm 0,5
	Anti-P40	2,075 \pm 0,5

ES 2 333 260 T3

En el agregado, estos experimentos demuestran que la neutralización de IL-23 evita, pero no revierte, la uveitis en modelos animales, e indican que el tratamiento con antagonistas de IL-23 debe tener un efecto beneficioso en la uveitis crónica en seres humanos evitando el reclutamiento de nuevas células T hacia el agrupamiento efector reduciendo, con ello, la gravedad y deteniendo el avance de la enfermedad.

Para ensaya si la deficiencia en IL-17 puede afectar al desarrollo de la EAU, ratones IL-17A^{-/-} (véase, por ejemplo, Nakae *et al.* (2002), *Immunity*, 17:375-387) se inmunizaron con un régimen uveitogénico de IRBP. La inhibición de la EAU por una deficiencia genética en IL-17 sólo es parcial (tabla 5). La reducción relativamente modesta de las puntuaciones de EAU en ratones IL-17^{-/-} puede ser explicada por el hecho de que estos ratones son deficientes en la isoforma IL-17A de la citoquina, y bajo condiciones de deficiencia congénita pueden compensarla con la isoforma IL-17F que habitualmente se produce con menos abundancia.

TABLA 5

Una deficiencia genética en IL-17 reduce, pero no abroga, la susceptibilidad a la EAU

Experimento n°	WT	IL-17A ^{-/-}
1	0,5*	0,5
	1,5	1,0
	0,8	0,9
	0,8	0,1
	0,4	0,9
	1,3	0,6
		0,5
2	0,5	0,5
	0,9	0,0
	1,8	0,3
	1,0	0,0
	1,5	
	0,5	
Puntuación de media ± EE	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1

Por contraste, la neutralización de IL-17A con anticuerpos IL-17A en ratones de tipo salvaje, a través de todo el curso de la enfermedad o sólo a través de la fase efectora (comenzando el día 7), resultó protector. De forma importante, a diferencia de la neutralización de IL-23, la neutralización de IL-17 puede inhibir la enfermedad cuando se administra comenzando en el día 7 después de la inmunización, cuando los efectores uveitogénicos ya se han generado. La reducción en las puntuaciones de la EAU se correlacionan con una reducción en las respuestas inmunológicas asociadas, una hipersensibilidad de tipo retrasado (DTH) y la proliferación de células de NL específicas del antígeno. Por tanto, la IL-17 desempeña un papel en la patogénesis de la EAU y, a diferencia de IL-23, parece participar en la fase efectora de la enfermedad. Los datos se muestran en la tabla 6.

TABLA 6

Un tratamiento con anticuerpos anti-IL-17A previene y revierte la EAU

Comienzo del tratamiento	Anticuerpo	Puntuación de EAU \pm EE	DTH \pm EE	Proliferación \pm EE ($\times 10^{-3}$)
día -1	Anti-isotipo	1,6 \pm 0,7	16 \pm 1	19,2 \pm 1,2
	Anti-IL-17	0,025 \pm 0,025	7,6 \pm 2	6,6 \pm 6,4
día 7	Anti-isotipo	1,6 \pm 0,6	20,2 \pm 3	25,4 \pm 1,4
	Anti-IL-17	0,5 \pm 0,5	6,0 \pm 2	5,9 \pm 0,3

Sección II. *Materiales y métodos*A. *General*

Los métodos convencionales de la biología molecular están descritos (Maniatis, *et al.* (1982), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook y Russell (2001), *Molecular Cloning*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993), *Recombinant DNA*, vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). También aparecen métodos convencionales en Ausbel, *et al.* (2001), *Current Protocols in Molecular Biology*, vols.1-4, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, NY, que describe la clonación en células bacterianas y la mutagénesis de ADN (vol. 1), la clonación en células de mamífero y levaduras (vol. 2), glicoconjugados y expresión de proteínas (vol. 3), y bioinformática (vol. 4).

Los métodos para la purificación de proteínas, incluyendo la inmunoprecipitación, la cromatografía, la electroforesis, la centrifugación y la cristalización están descritos (Coligan, *et al.* (2000), *Current Protocols in Protein Science*, vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York). El análisis químico, la modificación química, la modificación post-traduccional, la producción de proteínas de fusión, y la glicosilación de proteínas están descritos (véase, por ejemplo, Coligan, *et al.* (2000), *Current Protocols in Protein Science*, vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Ausubel, *et al.* (2001), *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001), *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO, pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001), *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391). La producción, purificación y fragmentación de anticuerpos policlonales y monoclonales están descritas (Coligan, *et al.* (2001), *Current Protocols in Immunology*, vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Harlow y Lane (1999), *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow y Lane, *supra*). Las técnicas convencionales para caracterizar interacciones de ligando/receptor están disponibles (véase, por ejemplo, Coligan, *et al.* (2001), *Current Protocols in Immunology*, vol. 4, John Wiley, Inc., Nueva York).

Los métodos para la citometría de flujo, incluyendo la clasificación celular por fluorescencia (FACS), están disponibles (véase, por ejemplo, Owens, *et al.* (1994), *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001), *Flow Cytometry*, 2ª ed., Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003), *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ). Los reactivos fluorescentes adecuados para modificar ácidos nucleicos, incluyendo cebadores y sondas de ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos para su uso, por ejemplo, como reactivos de diagnóstico, están disponibles (catálogo de Molecular Probes (2003), Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; catálogo de Sigma-Aldrich (2003), St. Louis, MO).

Los métodos convencionales de histología del sistema inmunológico están descritos (véase, por ejemplo, Muller-Harmelink (ed.) (1986), *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, Nueva York, NY; Hiatt, *et al.* (2000), *Color Atlas of Histology*, Lippincott, William, and Wilkins, Phila, PA; Louis, *et al.* (2002), *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, Nueva York, NY).

Los paquetes informáticos y las bases de datos para determinar, por ejemplo, los fragmentos antigénicos, la secuencia conductora, el plegamiento de las proteínas, los dominios funcionales, los sitios de glicosilación y los alineamientos de secuencia están disponibles (véase, por ejemplo, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne, *et al.* (2000), *Bioinformatics* 16:741-742; Menne, *et al.* (2000), *Bioinformatics Applications Note*, 16:741-742; Wren, *et al.* (2002), *Comput. Methods Programs Biomed.*, 68:177-181; von Heijne (1983), *Eur. J. Biochem.*, 133:17-21; von Heijne (1986), *Nucleic Acids Res.*, 14:4683-4690).

B. Animales

Los ratones IL-23 KO (p19 KO) son descritos en Cua, *et al.* (2003), *Nature*, 421:744-748. Los ratones IL-17^{-/-} se produjeron como se describe en Nakae, *et al.* (2002), *Immunity*, 17:375-387. Los ratones IL-12p35 KO (P35 KO), IL-12p40 KO (P40 KO), IFN- γ KO (GKO) (todos se basaban en C57BL/6) y C57BL/6 y B10RIII se obtuvieron en Jackson Laboratories. Los animales se mantuvieron en unas instalaciones específicas exentas de patógenos y se les suministró agua y pienso convencional de laboratorio sin límites. El cuidado y uso de los animales se ajusta a las directrices institucionales y a la Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

C. Inducción y puntuación de la EAU

El CFA se obtuvo en Sigma. La cepa H37RA de *Mycobacterium tuberculosis* se obtuvo en Thomas Scientific. La PT de *Bordetella* purificada se obtuvo de Sigma-Aldrich. La IRBP se aisló a partir de retinas de bovino, como ha sido descrito previamente, utilizando una cromatografía de afinidad Con A-Sepharose y una cromatografía líquida de resolución rápida (véase, por ejemplo, Pepperberg *et al.* (1991), *Photochem. Photobiol.*, 54:1057-1060). Las preparaciones de IRBP se separaron en partes alícuotas y se conservaron a -70°C. El péptido derivado de IRBP 161-180 humano (Karabekian, Z. *et al.* (2005), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 46(10):3769-3776) se sintetizó mediante química de Fmoc (sintetizador peptídico modelo 432A; Applied Biosystems, Foster City, CA).

Los anticuerpos neutralizantes anti-IL-23 de ratón y anti-IL-17A de ratón fueron suministrados por Scherin-Plough Biopharma (Palo Alto, CA). El anti-IL-23 de ratón había sido descrito previamente (véase, por ejemplo, Langrish *et al.* (2005), *J. Exp. Med.*, 201:233-240). El hibridoma C17.8 (anti-IL-12p40, IgG2a de rata) fue suministrado por Wistar Institute, Filadelfia, PA. El anticuerpo monoclonal se produjo en líquido de ascitis y se purificó mediante HPLC de intercambio iónico de Harlan Bioproducts for Science (Indianapolis, IN). El anti-CD4 de ratón marcado con FITC (clon L3T4), el anti-IL-17 de ratón marcado con PE (clon TC11-18H10) y el anti-IFN- γ marcado con APC (clon XMG1.2) y el bloqueador de la secreción de citoquinas (GolgiStopTM) se obtuvieron de Becton Dickinson (San Diego, CA). El PMA, y la ionomicina se obtuvieron en LC Laboratories (Boston, MA).

La EAU se indujo mediante la inmunización activa con 150 μ g de IRBP para ratones C57BL/6, y con 7 μ g de péptido IRBP 161-180 para ratones B10RIII (Jackson Labs, Maine). Para los ratones C57BL/6, se administró la toxina de *Bordetella pertussis* (0,5 μ g/ratón) en PBS que contenía suero de ratón normal al 2% mediante una inyección intraperitoneal al mismo tiempo que la inmunización y, en algunos experimentos, la IRBP fue sembrada con 500 μ g de péptido IRBP 1-20 (Avichezer, D. *et al.* (2000), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41(1):127-131) para potenciar las puntuaciones de enfermedad, normalmente modestas, que aparecen en esta raza. La disolución del antígeno se emulsionó 1:1 v/v en CFA que se había suplementado con la cepa H37RA de *Mycobacterium tuberculosis* hasta 2,5 mg/ml. Se inyectó un total de 200 μ l de emulsión por vía subcutánea, divididos en 3 sitios (base de la cola y ambos muslos).

Como alternativa, la EAU se indujo mediante transferencia adoptiva de una línea de células T uveitogénicas (véase a continuación). Se inyectaron por vía intraperitoneal 1-2 millones de células, recién estimuladas con el antígeno. La EAU clínica se evaluó mediante fundoscopia bajo un microscopio binocular después de la dilatación de la pupila y se puntuó sobre una escala de 0-4 utilizando criterios basados en el grado de las lesiones inflamatorias, como se describe con detalle en varios informes (véase, por ejemplo, Agarwal y Caspi (2004), *Methods Mol. Med.*, 102:395-419; y Chan *et al.* (1990), *J Autoimmun.*, 3:247-255). Los ojos recogidos 17-21 días después de la inmunización, o 14 días después de la transferencia adoptiva, se fijaron en glutaraldehído tamponado con fosfato al 4% durante 1 h (para evitar el desprendimiento artefactual de la retina) y después se trasladaron a formaldehído tamponado con fosfato al 10% hasta su procesamiento. El tejido fijado y deshidratado se rodeó de metacrilato, y se tiñeron secciones de 4 a 6 μ m con H&E convencional. Las secciones de ojo cortadas a través de los planos de la pupila-nervio óptico se puntuaron de manera enmascarada. La gravedad de la EAU se puntuó sobre una escala de 0-4 en incrementos de medio punto utilizando los criterios descritos previamente, basándose en el tipo, el número y el tamaño de las lesiones (véase, Agarwal y Caspi, *supra*; y Chan *et al.*, *supra*).

D. Determinación de las respuestas inmunológicas

La hipersensibilidad de tipo retrasado (DTH) a la IRBP se evaluó mediante el ensayo del hinchamiento de las orejas (véase, por ejemplo, Tarrant *et al.* (1998), *J. Immunol.*, 161:122-127). Para la proliferación de linfocitos específica del Ag y la producción de citoquinas en cultivos primarios, se recogieron el bazo y los nódulos linfáticos drenantes (inguinal e ilíaco) (5 por grupo) al final de cada experimento como se indica. Las células linfoides se reunieron dentro del grupo y se incubaron en dosis graduadas de Ag en cultivos por triplicado de 0,2 ml, esencialmente como se describe (véase, por ejemplo, Avichezer *et al.* (2000), *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41:127-131). La proliferación se determinó mediante la captación de [³H]timidina. Las citoquinas se cuantificaron en sobrenadantes estimulados con Ag de 48 h utilizando la tecnología de Pierce Multiplex SearchLight Arrays (véase, por ejemplo, Moody *et al.* (2001), *Biotechniques*, 31:186-190, 192-184).

E. Neutralización de IL-23, IL-12p40, e IL-17

Se inmunizaron ratones B10RIII con IRBP o con péptido uveitogénico de IRBP (161-180) como se indica. Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 0,5 mg por dosis de anti-p19, anti-p40, o anti-IL-17. El tratamiento se administró en días alternos, comenzando en el día -1 hasta el día 15 después de la inmunización, cubriendo ambas fases de cebado y efectora (protocolo de prevención), o comenzando en el día 7 hasta el día 15, cubriendo sólo la fase efectora (tratamiento). Los controles recibieron el mismo régimen de isotipo (IgG1 de rata). Los ojos y los órganos linfoides se recogieron en el día 17, 6-7 días después de la aparición de la enfermedad.

F. Línea de células T uveitogénicas

La línea de células Th1 uveitogénica específica de un péptido de la IRBP humana (p16-180) ha sido descrita (véase, por ejemplo, Silver *et al.* (1995), Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 36:946-954). Brevemente, la línea se derivó de nódulos linfáticos drenantes de ratones B10.RIII inmunizados con el péptido IRBP humano 161-180, polarizada *in vitro* hacia el fenotipo Th1 mediante un cultivo en presencia de antígeno, IL-12, y anti-IL-4. Después las células se mantuvieron en ciclos alternantes de expansión en IL-2 y reestimulación con 1 µg/ml de p161-180 cada 2 a 3 semanas en presencia de esplenocitos singeneicos, irradiados con 3000 rads, como APC. Para la inducción de la EAU, células recién estimuladas con Ag durante 48 h se inyectaron por vía intraperitoneal en receptores singeneicos sin estimular.

G. Detección de IL-17 e IFNγ intracelular

Estimulación corta: Una línea de células T se estimuló con péptido IRBP 161-180 1 µg/ml en presencia de APC irradiadas durante 24 h con la adición del inhibidor de la transferencia de proteínas GolgiStop™ (BD Biosciences, San Jose, CA) en las últimas 4 h. Después, las células se separaron en Ficoll, se lavaron y se tiñeron para detectar CD4 extracelular. Después las células se lavaron, se fijaron, se permeabilizaron con fijación Cytofix/Cytoperm™ y tampón de permeabilización (BD Biosciences) y se tiñeron con anti-IL-17 conjugado con PE y anti-IFN-γ conjugado con APC para el análisis FACS.

Estimulación larga: Una línea de células T se estimuló durante 5 días con antígeno (péptido IRBP 161-180 1 µg/ml) o antígeno + rIL-23 (10 ng/ml) o antígeno + IL-23 + anti-IFN-γ (10 µg/ml) en presencia de APC irradiadas. Durante las últimas 4 h de incubación, las células se estimularon con PMA e ionomicina con la adición del inhibidor de la transferencia de proteínas GolgiStop™ (BD Biosciences). Después las células se trataron y se tiñeron para la IL-17 e IFN-γ intracelular como se mencionó anteriormente.

H. Ensayos de IL-17 e IFNγ

Después de 48 h de estimulación con péptido IRBP 161-180 1 µg/ml en presencia de APC irradiadas, la línea de células T se transfirió adoptivamente (2 x 10⁶/ratón) por vía intravenosa a ratones heterocigóticos sin estimular Thy1.1/2. Después de 90 h los bazo se recogieron y los esplenocitos se estimularon con péptido IRBP 161-180 durante 24 h con la presencia de PMA, ionomicina e inhibidor de la transferencia de proteínas GolgiStop™ (BD Biosciences) en las últimas 4 h. Después las células se trataron y se tiñeron para la IL-17 e IFN-γ intracelular como se mencionó anteriormente.

I. Análisis estadístico

Los experimentos se repitieron al menos dos veces, y normalmente tres o más veces. Las tablas muestran los datos compilados de un experimento representativo. El análisis estadístico de las puntuaciones de EAU se realizó mediante el ensayo de Snedecor y Cochran para la tendencia lineal en proporciones (no paramétrico, basado en frecuencias) (véase, por ejemplo, Snedecor y Cochran (1967), Statistical Methods Iowa State University Press, Ames, IA:p. 248). Cada ratón (media de ambos ojos) se trató como un único acontecimiento estadístico. Se estudió el DTH y la proliferación en un ensayo de la t (2 colas). Las respuestas de citoquinas se ensayaron en muestras reunidas (normalmente 5 ratones por grupo).

Las realizaciones específicas descritas en esta memoria se ofrecen sólo a modo de ejemplo, y la invención tiene que ser limitada por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de los equivalentes autorizados por dichas reivindicaciones; y la invención no tiene que ser limitada por las realizaciones específicas que han sido presentadas aquí a modo de ejemplo.

La cita en la presente a cualquier publicación o documento de patente no pretende ser un reconocimiento de que dicha referencia citada sea pertinente a la técnica anterior, ni tampoco constituye un reconocimiento de los contenidos o fecha de la técnica anterior efectiva de la referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de IL-17 para su uso para tratar un paciente con una enfermedad inflamatoria ocular autoinmuno-
nológica (AOID).
2. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 1, en el que el paciente se ha diagnosticado como que padece una inflamación ocular de etiología autoinmunológica putativa.
3. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 1, en el que una dosis especificada del antagonista de IL-17 se administra en un intervalo especificado durante un primer periodo de tratamiento.
4. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 3, en el que el primer periodo de tratamiento finaliza después de la desaparición de uno o más síntomas de la AOID.
5. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 4, en el que el primer periodo de tratamiento finaliza en 30 días después de la desaparición de todos los síntomas de la AOID.
6. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 4, en el que la dosis del antagonista de IL-17 administrada se reduce gradualmente durante un segundo periodo de tratamiento que comienza tras la finalización del primer periodo de tratamiento.
7. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 6, en el que la duración del segundo periodo de tratamiento es de al menos un año.
8. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 1, en el que el antagonista de IL-17 es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de un anticuerpo monoclonal.
9. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 8, en el que el antagonista de IL-17 es un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal totalmente humano.
10. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 8, en el que el antagonista de IL-17 es un fragmento de un anticuerpo monoclonal humanizado o un fragmento de un anticuerpo monoclonal totalmente humano.
11. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento de un anticuerpo monoclonal está pegilado.
12. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento de un anticuerpo monoclonal se une e inhibe la actividad de IL-17.
13. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento de un anticuerpo monoclonal se une e inhibe la actividad de IL17RA o IL-17RC.
14. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 1, en el que el antagonista de IL-17 es un anticuerpo biespecífico o un fragmento de un anticuerpo biespecífico que se une e inhibe la actividad de a) IL-17 e IL-23p19, o b) IL-17 e IL-23R.
15. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 3, en el que dicho tratamiento comprende además administrar un antagonista de IL-23 al paciente durante el primer periodo de tratamiento.
16. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 15, en el que una dosis especificada del antagonista de IL-23 se administra en un intervalo especificado durante el primer periodo de tratamiento.
17. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 16, en el que el primer periodo de tratamiento finaliza después de la desaparición de uno o más síntomas de la AOID.
18. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 16, en el que el primer periodo de tratamiento finaliza en 30 días después de la desaparición de todos los síntomas de la AOID.
19. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 18, en el que la dosis de cada uno del antagonista de IL-17 y del antagonista de IL-23 se reduce gradualmente durante un segundo periodo de tratamiento que comienza tras la finalización del primer periodo de tratamiento.
20. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 18, en el que la dosis del antagonista de IL-17 se reduce gradualmente durante un segundo periodo de tratamiento que comienza tras la finalización del primer periodo de tratamiento, y en el que la dosis del antagonista de IL-23 administrada durante el segundo periodo de tratamiento es la misma que la dosis administrada en el primer periodo de tratamiento, y en el que el segundo periodo de tratamiento finaliza cuando la terapia con el antagonista de IL-17 se detiene.

ES 2 333 260 T3

21. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 20, en el que la duración del segundo periodo de tratamiento es de entre un mes y tres meses.

22. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 20, en el que dicho tratamiento comprende además administrar el antagonista de IL-23 durante un tercer periodo de tratamiento que comienza tras la finalización del segundo periodo de tratamiento.

23. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 22, en el que la duración del tercer periodo de tratamiento es de entre seis meses y doce meses.

24. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 22, en el que la dosis del antagonista de IL-23 se reduce gradualmente durante el tercer periodo de tratamiento.

25. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 15, en el que el antagonista de IL-23 es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de un anticuerpo monoclonal.

26. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 25, en el que el antagonista de IL-23 es un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

27. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 25, en el que el antagonista de IL-23 es un fragmento de un anticuerpo monoclonal humanizado o un fragmento de un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

28. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 25, en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento de un anticuerpo monoclonal está pegilado.

29. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 25, en el que el antagonista de IL-23 se une e inhibe la actividad de IL-23p19.

30. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 25, en el que el antagonista de IL-23 se une e inhibe la actividad de IL-23R.

31. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 1, en el que la AOID es la uveitis.

32. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 1, en el que dicho tratamiento comprende además administrar un agente terapéutico que no antagonice la actividad IL-17 o IL-23, en el que el agente terapéutico es capaz de aliviar al menos un síntoma de la AOID o al menos un efecto secundario del antagonista de IL-17.

33. El antagonista de IL-17 de la reivindicación 32, en el que el agente terapéutico es capaz de aliviar al menos un síntoma de la AOID, y es un esteroide, un agente antiinflamatorio no esteroideo o un inhibidor de TNF.

34. Un antagonista seleccionado del grupo que consiste en un antagonista de IL-23, un antagonista de IL-17, y un antagonista de ambas IL-17 e IL-23, para su uso para el tratamiento profiláctico de un paciente que está diagnosticado como susceptible a una enfermedad inflamatoria ocular autoinmunitaria (AOID).

35. El antagonista de la reivindicación 34, en el que el diagnóstico de susceptibilidad se basa en que el paciente ha tenido un incidente previo de inflamación ocular.

36. El antagonista de la reivindicación 34, en el que el diagnóstico de susceptibilidad se basa en que el paciente tiene una enfermedad autoinmunitaria sistémica.

37. El antagonista de la reivindicación 36, en el que el antagonista es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de un anticuerpo monoclonal.

38. El antagonista de la reivindicación 37, en el que el antagonista es un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

39. El antagonista de la reivindicación 37, en el que el antagonista es un fragmento de un anticuerpo monoclonal humanizado o un fragmento de un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

40. El antagonista de la reivindicación 37, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo está pegilado.

41. El antagonista de la reivindicación 37, en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento de un anticuerpo monoclonal se une e inhibe la actividad de IL-23p19 o IL-23R.

42. El antagonista de la reivindicación 41, en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento de un anticuerpo monoclonal se une e inhibe la actividad de IL-23p19.

ES 2 333 260 T3

43. El antagonista de la reivindicación 37, en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento de un anticuerpo monoclonal se une e inhibe la actividad de IL-17 o IL-17RA.

44. El antagonista de la reivindicación 43, en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento de un anticuerpo monoclonal se une e inhibe la actividad de IL-17.

45. El antagonista de la reivindicación 34, en el que una dosis especificada del antagonista se administra en un intervalo especificado durante un primer periodo de tratamiento.

46. El antagonista de la reivindicación 45, en el que la duración del primer periodo de tratamiento es de entre tres meses y dos años.

47. El antagonista de la reivindicación 46, en el que la duración del primer periodo de tratamiento es de entre seis meses y un año.

48. El antagonista de la reivindicación 45, en el que la dosis del antagonista se reduce gradualmente durante un segundo periodo de tratamiento que comienza tras la finalización del primer periodo de tratamiento.

49. El antagonista de la reivindicación 48, en el que la duración del segundo periodo de tratamiento es de entre un mes y seis meses.

50. Un antagonista de IL-23 para su uso para tratar un paciente con una enfermedad inflamatoria ocular autoinmunitaria (AOID).

51. El antagonista de IL-23 de la reivindicación 50, en el que el antagonista de IL-23 es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de un anticuerpo monoclonal que se une e inhibe la actividad de IL-23p19 o IL-23R.

52. El antagonista de IL-23 de la reivindicación 50, en el que una dosis especificada del antagonista de IL-23 se administra en un intervalo especificado durante un primer periodo de tratamiento.

53. El antagonista de IL-23 de la reivindicación 50, en el que la duración del primer periodo de tratamiento es de entre tres meses y dos años.

54. El antagonista de IL-23 de la reivindicación 51, en el que la duración del primer periodo de tratamiento es de entre seis meses y un año.

55. El antagonista de IL-23 de la reivindicación 50, en el que la dosis del antagonista de IL-23 se reduce gradualmente durante un segundo periodo de tratamiento que comienza tras la finalización del primer periodo de tratamiento.

56. El uso de un antagonista de IL-17 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria ocular autoinmunitaria (AOID) en un paciente.

57. El uso de la reivindicación 56, en el que la composición farmacéutica es para ser administrada a una dosis especificada del antagonista de IL-17 en un intervalo especificado durante un primer periodo de tratamiento.

58. El uso de la reivindicación 57, en el que el primer periodo de tratamiento finaliza después de la desaparición de uno o más síntomas de la AOID.

59. El uso de la reivindicación 57, en el que el primer periodo de tratamiento finaliza a los 30 días después de la desaparición de todos los síntomas de la AOID.

60. El uso de la reivindicación 57, en el que la dosis del antagonista de IL-17 en la composición farmacéutica se reduce gradualmente durante un segundo periodo de tratamiento que comienza tras la finalización del primer periodo de tratamiento.

61. El uso de la reivindicación 60, en el que la duración del segundo periodo de tratamiento es de al menos un año.

62. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 56 a 61, en el que el antagonista de IL-17 es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de un anticuerpo monoclonal.

63. El uso de la reivindicación 62, en el que el antagonista de IL-17 es un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

64. El uso de la reivindicación 62, en el que el antagonista de IL-17 es un fragmento de un anticuerpo monoclonal humanizado o un fragmento de un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

65. El uso de la reivindicación 62, en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo monoclonal está pegilado.

ES 2 333 260 T3

66. El uso de la reivindicación 62, en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento de un anticuerpo monoclonal se une e inhibe la actividad de IL-17.

67. El uso de la reivindicación 62, en el que el anticuerpo monoclonal o el fragmento de un anticuerpo monoclonal se une e inhibe la actividad de IL-17RA o IL-17RC.

68. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 56 a 61, en el que el antagonista de IL-17 es un anticuerpo biespecífico o un fragmento de un anticuerpo biespecífico que se une e inhibe la actividad de a) IL-17 e IL-23p19, o b) IL-17 e IL-23R.

69. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 56 a 61, en el que un antagonista de IL-23 es para ser administrado en asociación con la composición farmacéutica.

70. El uso de la reivindicación 69, en el que la composición farmacéutica y el antagonista de IL-23 son para ser administrados al mismo tiempo o de manera consecutiva.

71. El uso de la reivindicación 70, en el que el antagonista de IL-23 es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal totalmente humano, un fragmento de un anticuerpo monoclonal humanizado, o un fragmento de un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

72. El uso de la reivindicación 71, en el que el antagonista de IL-23 se une e inhibe la actividad de IL-23p19 o IL-23R.

73. El uso de un antagonista de IL-23 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria ocular autoinmunitaria (AOID) en un paciente, en el que la composición farmacéutica es para ser administrada en asociación con un antagonista de IL-17.

74. El uso de la reivindicación 73, en el que la composición farmacéutica es para ser administrada a una dosis especificada del antagonista de IL-23 en un intervalo especificado durante un primer periodo de tratamiento.

75. El uso de la reivindicación 74, en el que la composición farmacéutica se administra también durante un segundo periodo de tratamiento que comienza tras la finalización del primer periodo de tratamiento, y en el que la dosis del antagonista de IL-17 que se administra se reduce gradualmente durante el segundo periodo de tratamiento.

76. El uso de la reivindicación 75, en el que el segundo periodo de tratamiento finaliza cuando la terapia con el antagonista de IL-17 se detiene.

77. El uso de la reivindicación 75, en el que la duración del segundo periodo de tratamiento es de entre un mes y tres meses.

78. El uso de la reivindicación 75, en el que la composición farmacéutica se administra además durante un tercer periodo de tratamiento que comienza tras la finalización del segundo periodo de tratamiento.

79. El uso de la reivindicación 78, en el que la duración del tercer periodo de tratamiento es de entre seis meses y doce meses.

80. El uso según la reivindicación 78, en el que la dosis del antagonista de IL-23 en la composición farmacéutica se reduce gradualmente durante el tercer periodo de tratamiento.

81. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 73 a 80, en el que la composición farmacéutica y el antagonista de IL-17 son para ser administrados al mismo tiempo o de manera consecutiva.

82. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 73 a 80, en el que el antagonista de IL-23 es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal totalmente humano, un fragmento de un anticuerpo monoclonal humanizado, o un fragmento de un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

83. El uso de la reivindicación 82, en el que el antagonista de IL-23 se une e inhibe la actividad de IL-23p19 o IL-23R.

84. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 73 a 80, en el que el antagonista de IL-17 es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal totalmente humano, un fragmento de un anticuerpo monoclonal humanizado, o un fragmento de un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

85. El uso de la reivindicación 82, en el que el antagonista de IL-17 se une e inhibe la actividad de IL-17, IL-17RA o IL-17RC.

86. El uso de la reivindicación 56 ó 73, en el que la AOID es la uveítis.

ES 2 333 260 T3

87. El uso de la reivindicación 56 ó 73, en el que dicha composición farmacéutica comprende además un agente terapéutico que no antagonice la actividad IL-17 o IL-23, en el que el agente terapéutico es capaz de aliviar al menos un síntoma de la AOID o al menos un efecto secundario del antagonista.

5 88. El uso de la reivindicación 87, en el que el agente terapéutico es capaz de aliviar al menos un síntoma de la AOID, y es un esteroide, un agente antiinflamatorio no esteroideo o un inhibidor de TNF.

89. El uso de un antagonista seleccionado del grupo que consiste en un antagonista de IL-23, un antagonista de IL-17 y un antagonista de ambos IL-17 e IL-23 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento
10 profiláctico de un paciente que está diagnosticado como susceptible a una inflamación autoinmunitaria ocular.

90. El uso de la reivindicación 89, en el que el diagnóstico de susceptibilidad se basa en que el paciente ha tenido un incidente previo de inflamación autoinmunitaria ocular.

15 91. El uso de la reivindicación 89, en el que el diagnóstico de susceptibilidad se basa en que el paciente tiene una enfermedad autoinmunitaria sistémica.

92. El uso de la reivindicación 89, en el que el antagonista es un antagonista de IL-23.

20 93. El uso de la reivindicación 92, en el que el antagonista es un anticuerpo monoclonal humanizado, un anticuerpo monoclonal totalmente humano, un fragmento de un anticuerpo monoclonal humanizado, o un fragmento de un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

25 94. El uso de la reivindicación 93, en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se une e inhibe la actividad de IL-23 o IL-23R.

95. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 89 a 94, en el que la composición farmacéutica es para ser administrada a una dosis especificada del antagonista en un intervalo especificado durante un primer periodo de
30 tratamiento.

96. El uso de la reivindicación 95, en el que la duración del primer periodo de tratamiento es de entre tres meses y dos años.

35 97. El uso de la reivindicación 96, en el que la duración del primer periodo de tratamiento es de entre seis meses y un año.

98. El uso de la reivindicación 97, en el que la dosis del antagonista en la composición farmacéutica se reduce gradualmente durante un segundo periodo de tratamiento que comienza tras la finalización del primer periodo de
40 tratamiento.

99. El uso de la reivindicación 98, en el que la duración del segundo periodo de tratamiento es de entre un mes y seis meses.

45 100. Un producto de fármaco manufacturado para su uso para tratar una enfermedad inflamatoria ocular autoinmunitaria (AOID), que comprende

(a) una primera formulación farmacéutica que comprende un antagonista de IL-17; y

50 (b) una segunda formulación farmacéutica que comprende un antagonista de IL-23, y que opcionalmente comprende además instrucciones para administrar las formulaciones farmacéuticas según se definió en una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24.

55

60

65