



Nota
RCT

Superintendencia de Industria y Comercio
INVENTAR

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización y
Digitalización CSA Ltda

09-144823

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

Se le los
primeros 15 Revendedores.
Caus

TITULO: BIOMARCADO
PARA TERAPIA ANTI-IN

ACIONES
NFLAMATORIO

SOLICITANTE: SCHERING

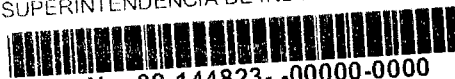
DIRECCIÓN: 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ 07033-0530 E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 17 de Diciembre de 2009

P2009/000215

Canal No pago Exclut
Fr 20-01-2010



No. 09-144823-00000-0000

Fecha: 2009-12-17 16:57:41 Dep. 2020 DIR.NUEVASCH
Ira 11 PATENTEYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 228

PETITORIO - FORMULARIO U
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2009/000215

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: SCHERING CORPORATION

Dirección: 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth,
NJ 07033-0530 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____ **Fax:** _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ **NIT** ☐

C.E. ☐ **Otro** ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center, Torre A, Calle
100 No. 8A-37 Piso 10.

Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ **NIT** ☐

C.E. ☐ **Otro** ☐

Cual _____

Número 79.782.747 Btá
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: 1. EDWARD PAUL BOWMAN 2. CHENG-CHI CHAO Y 3. SHI-JUAN
CHEN

Dirección: 1. 1633 Alameda de las Pulgas Redwood City, CA 94061, 2. 1205
Bretmoor Way, San José, CA 95129, 3. 5048 Campion Drive, San Ramon, CA 94582

Nacionalidad o Domicilio: 1, 2 y 3 Estadounidense.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/007770

Fecha Junio 20, 2008

Publicación Internacional No. WO 2008/156865

Fecha Diciembre 24, 2008

6

Título (54) BIOMARCADORES DE DESTRUCCIÓN DE ARTICULACIONES PARA
TERAPIA ANTI-INTERLEUCINA-17A DE REUMATISMO INFLAMATORIO

Clasificación Internacional (51) G01N 33/50

Prioridad

SI ☒ **NO** ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Junio 20, 2007

(31) Número de Solicitud

60/945.239

9

Comprobante de pago No. 09-93.754

Fecha Diciembre 14 de 2009

10

ANEXOS

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 07-132.393



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

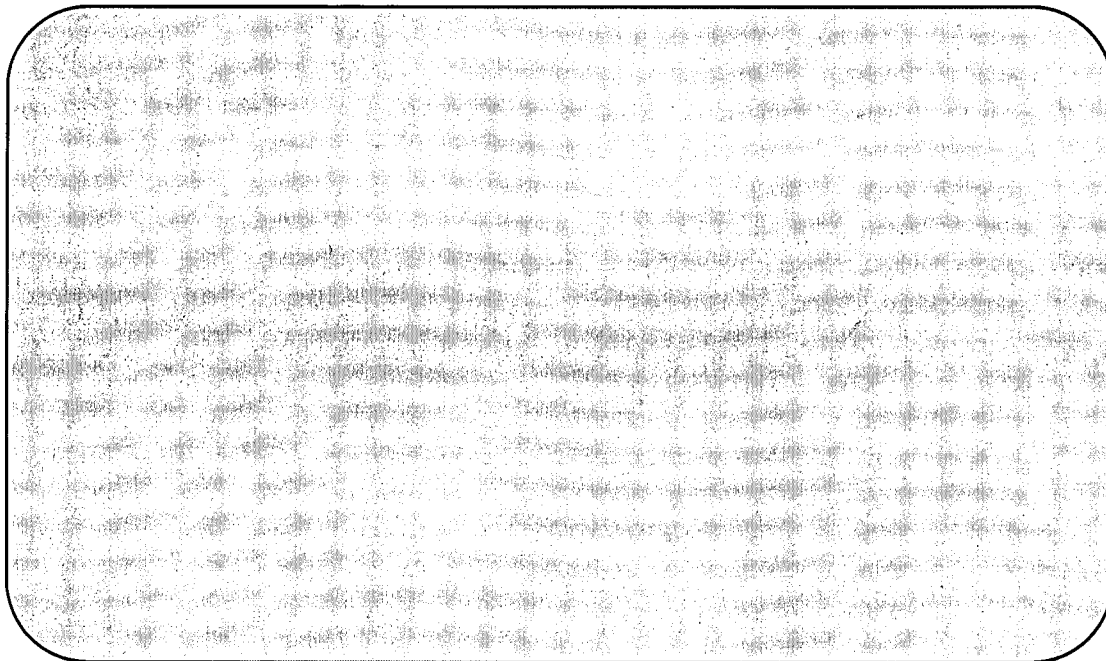


De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



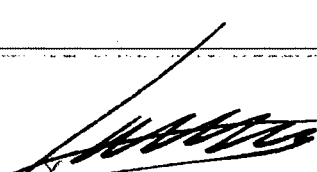
Otros. Búsqueda Internacional.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTEFIRMA: C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 93,754
FECHA : DICIEMBRE 14 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-144823- -00000-0000

Fecha: 2009-12-17 16:57:41 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra 11 PATENTE/III Lve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 228

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	131166394	14/12/2009	4,669,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE
SCHERING CORPORATION**

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
- Este documento Público
2. ha sido firmado por Marguerite La Corte
3. Quien ejerce funciones de Notario público de Nueva Jersey
4. Lleva el sello de Marguertie La Corte Notario

CERTIFICADO

5. En Trenton, Nueva Jersey
6. El 29 de agosto 2003
7. Por John E. McCormac Contador Publico- Tesorero de Nueva Jersey
8. No. A 180345
9. Gran Sello del Estado de Nueva Jersey
10. Firma legible de John M.

PODER DE REPRESENTACIÓN

Bilingüe inglés- español otorgado en Kenilworth, Nueva Jersey, Estados Unidos, el 7 de agosto de 2003 y firmado por Edward H. Mazer - Director Juridico senior.

CERTIFICADO NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, fechado el 7 de agosto, 2003 certificando las funciones de Edward H. Mazer - Director Juridico senior, de Schering Corporation.

Las certificaciones anteriores se basan en el Poder de representación fechado el 4 noviembre de 2002.

Sello: Marguerite La Corte- Notario público,
Estado de Nueva Jersey
Su comisión vence el 7 de octubre de 2003.
Sello en alto relieve del Notario Público

Es traducción fiel del inglés, con
confrontación. Bogotá 5 septiembre, 2003.

copia archivo, para

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

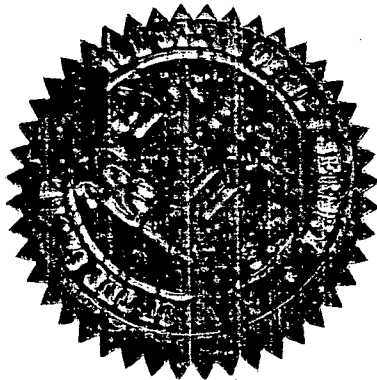
5
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MARGUERITE LA CORTE
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MARGUERITE LA CORTE, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 29TH DAY OF AUGUST 2003
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A180345
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



John E McCormac

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

6

Power of Attorney

The undersigned,
SCHERING CORPORATION

domiciled in
2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, New Jersey 07033-0532, U.S.A.

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models and Industrial Designs in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Poder

El suscrito,

domiciliado en
por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte y/o Ana María Frieri

podrá especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:



Edward H. Mazer, Senior Legal Director

Date/Fecha:

August 7, 2003

City/Country/Ciudad, País: **Kenilworth, New Jersey, U.S.A.**

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
Fax: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date, **August 7, 2003**

The undersigned Notary Public certifies:

1. That **Edward H. Mazer**

of legal age and domiciled in

119 Greenwood Drive, Millburn, New Jersey 07041, U.S.A.

signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing document as **Senior Legal Director of SCHERING CORPORATION**

3. That **SCHERING CORPORATION** having its principal place of business located in **2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, New Jersey 07033-0530, U.S.A.** is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

Power of Attorney, dated November 4, 2002.

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

mayor de edad y domiciliado

suscribió el documento que antecede.

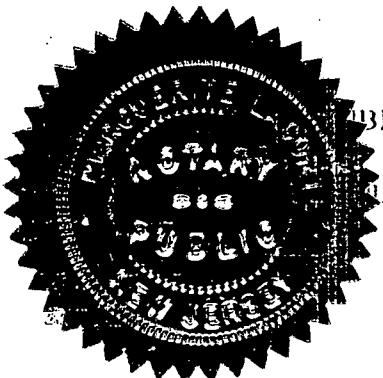
2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

4. Que con sede principal ubicada en **New Jersey 07033-0530, U.S.A.** está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

PUBLIC (Signature):



Marguerite La Corte
Marguerite La Corte
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires October 7, 2003

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 December 2008 (24.12.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/156865 A2

(51) International Patent Classification:
G01N 33/50 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/007770

(22) International Filing Date: 20 June 2008 (20.06.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/945,239 20 June 2007 (20.06.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **SCHERING CORPORATION** [US/US]; 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ 07033-0530 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BOWMAN, Edward, Paul** [US/US]; 1633 Alameda de las Pulgas, Redwood City, CA 94061 (US). **CHAO, Cheng-chi** [US/US]; 1205 Bretmoor Way, San Jose, CA 95129 (US). **CHEN, Shi-Juan** [US/US]; 5048 Campion Drive, San Ramon, CA 94582 (US).

(74) Agent: **HENDERSON, Melodie, W.**; Schering Corporation, Patent Department, K-6-1 1990, 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ 07033-0530 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(54) Title: JOINT DESTRUCTION BIOMARKERS FOR ANTI-IL-17A THERAPY OF INFLAMMATORY JOINT DISEASE

(57) Abstract: Novel methods and drug products for treating inflammatory joint diseases such as rheumatoid arthritis and associated arthritides are disclosed. The methods and products employ various serum markers of bone and cartilage metabolism or destruction, including cartilage oligomer matrix protein (COMP) and Receptor activator of NFB ligand (RANKL), as biomarkers to assess the effect of IL-17A antagonists on joint destruction in inflammatory joint diseases.



WO 2008/156865 A2

JOINT DESTRUCTION BIOMARKERS FOR ANTI-IL-17A THERAPY OF INFLAMMATORY JOINT DISEASE

5

The present application claims the benefit of U.S. Provisional Patent Application 60/945239, filed 20 June 2007.

FIELD OF THE INVENTION

10

The present invention relates generally to the treatment of inflammatory joint diseases with antagonists of interleukin-17A (IL-17A). More specifically, the invention relates to biomarkers that are correlated with the efficacy of IL-17A antagonists for inhibiting joint destruction in rheumatoid arthritis and associated arthritides.

15

BACKGROUND OF THE INVENTION

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory disease caused by the dys-regulation of the immune system resulting in joint inflammation, causing joint pain, discomfort, swelling and stiffness, with progressive bone and cartilage erosion. The combination of inflammation and structural joint damage results in loss of function which can lead to permanent disability.

20

IL-17A, which was originally named cytotoxic T-Lymphocyte-associated antigen 8 (CTLA8) is a homodimeric cytokine that binds to IL-17RA (also known as IL17R) and IL-17RC. The functional receptor for IL-17A is believed to be a multimeric receptor complex comprising one or both of IL-17RA and IL-17RC (e.g., an IL-17RA homodimer, an IL-17RC homodimer, or an IL-17RA/IL-17RC heterodimer) and possibly a third, as yet unknown, protein (Toy, D. et al., (2006) *J. of Immunol.* 177(1):36-39; unpublished data).

25

30

IL-17A is produced by a subset of T cells known as Th17 cells, whose differentiation is initiated by TGF-beta signaling in the context of proinflammatory cytokines, particularly IL-6, IL-1-beta and TNF-alpha, and whose maintenance and survival are dependent on interleukin-23 (IL-23) (Langrish, C.L. et al. (2005), *J. Exp. Med.* 201:233-240; Harrington, L.E., et al., (2005), *Nat. Immunol.* 6:1123-1132; Veldhoen, M. et al., (2006) *Immunity* 24:179-189). IL-23 is a heterodimeric cytokine comprised of two subunits: p19, which is unique to IL-23; and p40, which is shared with IL-12. IL-23 mediates signaling by binding to a heterodimeric receptor, comprised of IL-23R and IL-12Rbeta1 (IL12RB1), which is shared by the IL-12 receptor. Studies in murine disease models suggest that IL-23-dependent Th17 cells

play a pathogenic role in autoimmune and chronic inflammatory diseases (Langrish et al., *supra*, Park, H., et al. (2005), *Nat. Immunol.* 6:1133-1141).

IL-17A is present in RA synovial fluid at the earliest stages of the disease along with other known inflammatory mediators such as TNF and IL-1 β . Dys-regulated IL-17A expression within an inflamed joint singly, and in synergy with TNF and IL-1 β , stimulates multiple downstream proteases, chemokines and pro-inflammatory cytokines that collectively contribute to cartilage and bone erosion. A variety of IL-17A biological antagonists used in multiple rodent arthritis models have demonstrated that IL-17A blockade inhibits arthritis progression and the resulting joint destruction that occurs with a special emphasis on bone sparing (*see, e.g.*, Koenders MI, et al., (2006) *Ann. Rheum. Dis.* 65 (Suppl. 3):29-33). At least one anti-IL-17A antibody is being tested in clinical trials of human RA patients.

Currently, assessing the effect of anti-rheumatic drugs on the progression of joint destruction relies mainly on radiographic evaluation. However, how to use radiographic data in clinical trials is controversial (van der Heijde, D. et al, (2002) *Arthritis Rheum* 47:215-218).

In addition to being time consuming, radiography is impractical in early stages of RA in which symptoms reflecting the inflammatory process often predominate over symptoms related to joint destruction (Morozzi, G., et al, (2007) *Clin Rheumatol.*) Indeed, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which have traditionally been used as first line therapies for RA, are reasonably effective at ameliorating the signs and symptoms of inflammation, but have little efficacy in retarding joint destruction, leading to speculation that inflammation and subsequent joint destruction can be uncoupled (van den Berg, WB (2001), *Semin Arthritis Rheum.* 30:7-16; Geusens, P.P., et al. (2006), *Arthritis & Rheumatism* 54 (6):1772-1777).

Thus, there is a well-established clinical need for better tools to predict the effect of anti-rheumatic drugs on structural joint damage, with recent development efforts focused on various markers of cartilage and/or bone metabolism that are elevated in the serum or urine of

play a pathogenic role in autoimmune and chronic inflammatory diseases (Langrish et al., *supra*, Park, H., et al. (2005), *Nat. Immunol.* 6:1133-1141).

IL-17A is present in RA synovial fluid at the earliest stages of the disease along with other known inflammatory mediators such as TNF and IL-1 β . Dys-regulated IL-17A expression within an inflamed joint singly, and in synergy with TNF and IL-1 β , stimulates multiple downstream proteases, chemokines and pro-inflammatory cytokines that collectively contribute to cartilage and bone erosion. A variety of IL-17A biological antagonists used in multiple rodent arthritis models have demonstrated that IL-17A blockade inhibits arthritis progression and the resulting joint destruction that occurs with a special emphasis on bone sparing (*see, e.g.*, Koenders MI, et al., (2006) *Ann. Rheum. Dis.* 65 (Suppl. 3):29-33). At least one anti-IL-17A antibody is being tested in clinical trials of human RA patients.

Currently, assessing the effect of anti-rheumatic drugs on the progression of joint destruction relies mainly on radiographic evaluation. However, how to use radiographic data in clinical trials is controversial (van der Heijde, D. et al, (2002) *Arthritis Rheum* 47:215-218). In addition to being time consuming, radiography is impractical in early stages of RA in which symptoms reflecting the inflammatory process often predominate over symptoms related to joint destruction (Morozzi, G., et al, (2007) *Clin Rheumatol.*) Indeed, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which have traditionally been used as first line therapies for RA, are reasonably effective at ameliorating the signs and symptoms of inflammation, but have little efficacy in retarding joint destruction, leading to speculation that inflammation and subsequent joint destruction can be uncoupled (van den Berg, WB (2001), *Semin Arthritis Rheum.* 30:7-16; Geusens, P.P., et al. (2006), *Arthritis & Rheumatism* 54 (6):1772-1777). Thus, there is a well-established clinical need for better tools to predict the effect of anti-rheumatic drugs on structural joint damage, with recent development efforts focused on various markers of cartilage and/or bone metabolism that are elevated in the serum or urine of RA patients compared to normal subjects (Crnkic, M. et al., (2003) *Arthritis Res. Ther.* 5:R181-R185; Valleala, H., et al. (2003) *Eur. J. Endocrinol.* 148:527-530); Ziolkowska, M., et al. (2002) *Arthritis & Rheumatism* 46(7):1744-1753).

Articular cartilage in the joints is composed of the proteoglycan aggrecan, collagen (three α -chains form a triple helix), and other non-collagenous proteins (*e.g.*, cartilage oligomer matrix protein (COMP) and human cartilage glycoprotein-39 (HC gp-39), which is also known as YKL-40). Type I collagen is a major component of bone and other tissues; whereas, type II collagen is specifically localized to articular cartilage of the joint. At the ends

of type I and II collagen helixes are short, non-helical N- and C-terminal telopeptides containing covalent cross-links that connect to other α -chains, both within the same trimer and to adjacent trimers. Physiological and pathological cleavage of collagen by MMPs or Cathepsin K results in the generation of degradation products or neo-epitopes (e.g. C2C, C1,2C, C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (CTX-I), C-terminal cross-linking telopeptide of type II collagen (CTX-II), N-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (NTX-I)), which are released into the synovial fluid, serum, and urine. Cleavage of the collagen triple helix also releases non-collagenous proteins (e.g. COMP, YKL-40, aggrecan) previously incorporated in the collagen fibrils. These molecules are elevated in synovial fluid and serum under conditions of normal remodeling and pathological cartilage destruction.

Cartilage destruction also results in compensatory increased collagen synthesis by chondrocytes. Type I and II collagen is synthesized as a pro-molecule and once outside the cell, cleavage of pro-collagen releases N-terminal and C-terminal pro-peptides. Type II collagen C-terminal pro-peptide (CPII) levels correlate with new type II collagen synthesis. Cartilage destruction also increases aggrecan synthesis and the appearance of the "fetal form" of aggrecan that has the CS846 epitope. Increased CS846 levels in the serum reflect new aggrecan synthesis (versus cleavage of "old" aggrecan).

Bone destruction occurs via the generation of excessive numbers of osteoclasts that resorb the mineralized bone and degrade the organic matrix of the de-mineralized bone. Receptor activator of NF κ B (RANK) ligand (RANKL) is a cell-surface molecule expressed by activated T-cells, fibroblast-like synoviocytes (FLS), and osteoblasts that is critical in promoting the differentiation of pre-osteoclasts into mature osteoclasts, which are cells that can erode bone. RANKL can be shed by proteolytic cleavage (both cell surface and soluble RANKL are active), and is elevated in mouse arthritis and human RA serum. Membrane or soluble RANKL binds to RANK on pre-osteoclasts and delivers a differentiation signal. Osteoprotegerin (OPG) is a natural antagonist of this system by binding to RANKL and preventing its interaction with RANK on pre-osteoclasts.

Tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) isoform 5b is released into the serum by bone-resorbing osteoclasts as they transcytose degraded bone proteins from the resorbed bone surface to outside the bone. TRACP isoform 5b serum levels are elevated in bone resorption diseases. The amino acid sequence for TRACP5 is found in Accession No. for NM_001102405, NM_001102404 or NM_007388.



Some of these serum markers of bone and cartilage metabolism (or destruction) are elevated in RA patients and have some prognostic value in identifying patients that are at a higher risk of having more aggressive bone destruction. For example, elevated levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) have been associated with more aggressive radiographic progression (den Broeder, A. A., et al. (2002) *Ann Rheum Dis* 61(4): 311-318; Wollheim, F. A., et al. (1997) *Br J Rheumatol* 36(8): 847-8499; Skoumal, M., et al. (2003). *Scand J Rheumatol* 32(3):156-161; Mansson, B., et al. (1995), *J Clin Invest* 95(3):1071-1077; Lindqvist, E., et al. (2005) *Ann Rheum Dis* 64(2):196-201; Forslind, K., et al. (1992) *Br J Rheumatol* 31(9): 593-598; Fex, E., et al. (1997) *Br J Rheumatol* 36(11):1161-1165. Also, a low OPG/RANKL ratio predicted increased five year radiographic progression (Geusens, P. P. et al. (2006) *Arthritis Rheum* 54(6):1772-1777) and elevated CTX-I and CTX-II levels were associated with four year Sharp Score increase in early RA patients (Garnero, P., et al. (2002) *Arthritis Rheum* 46(11):2847-2856).

However, the inventors herein are not aware of any published studies that conclude that blocking IL-17A can inhibit bone erosion and modulate serum levels of any of the above proteins in severely arthritic animals. Thus, a need exists to identify biomarkers that correlate with inhibition of joint destruction by anti-IL-17A therapy.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention is based on the discovery described herein that COMP, OPG and RANKL serum levels in mice with collagen-induced arthritis (CIA) following treatment with an anti-IL-17A monoclonal antibody (Mab) are modulated by anti-IL-17A therapy. Also, the inventors have discovered that RANKL serum levels in CIA-mice decrease with increasing doses of the anti-IL-17A Mab, and reach normal levels at antibody doses that are effective at inhibiting joint destruction in the CIA mice as measured by traditional histological and μ -CT-based techniques. Based on these results with COMP, OPG and RANKL in the mouse CIA arthritis model, the inventors herein believe that these markers are likely to be useful as surrogate markers, i.e., biomarkers, of the effect of anti-IL-17A therapy on joint destruction in inflammatory joint diseases such as RA and associated arthritides. Also, these data obtained in arthritic mice support the use of other markers of cartilage and bone metabolism that are elevated in human RA patients, including CTX-I, CTX-II, and HC gp-39, as surrogate markers for monitoring the effect of anti-IL-17A therapy on joint destruction in patients with inflammatory joint disease.

In addition, it has been previously discovered that anti-IL-17A therapy is effective at inhibiting joint destruction in the CIA arthritis model, even when that therapy produces no apparent improvement in inflammation (WO 2008/021156). Thus, it is expected that anti-IL-17A therapy will be useful to inhibit ongoing bone erosion in human patients who have been previously treated with a different anti-rheumatic agent, regardless of whether or not the previous agent had reduced the signs and symptoms of inflammation. Thus, the present discovery of non-inflammation related markers that are correlated with inhibition of bone erosion by IL-17A therapy provides novel methods and products for treating patients for bone erosion who are inflammatory nonresponders or inflammatory responders to previous anti-rheumatic therapy.

Accordingly, one aspect of the present invention is a method of selecting a patient with an inflammatory joint disease for treatment with an IL-17A antagonist. The patient selection method comprises comparing the level(s) of at least one joint destruction biomarker in a serum sample taken from the subject with the normal range of serum levels for the biomarker and selecting the patient for treatment with the IL-17A antagonist if the level(s) of the joint destruction biomarker in the subject's serum sample is outside of the normal range.

In another aspect, the invention provides a method of predicting efficacy of an IL-17A antagonist in inhibiting bone erosion in a subject with an inflammatory joint disease. This efficacy prediction method comprises determining the levels of at least one joint destruction biomarker in serum samples taken from the subject prior to and at the end of an initial treatment period with the IL-17A antagonist, and comparing the levels of the biomarker in these pre-treatment and post-treatment serum samples. A normalization in the level of the biomarker during the initial treatment period predicts that the IL-17A antagonist will likely be effective in inhibiting joint destruction in the subject. In a preferred embodiment, the prediction method further comprises determining the level of the biomarker in a third serum sample taken from the subject at the end of a subsequent treatment period with the IL-17A antagonist; if the level of the biomarker in the third serum sample is more normalized than the level of the biomarker in the second serum sample, then the IL-17A antagonist is predicted to be effective in inhibiting joint destruction in the subject. Preferred initial treatment periods are at least one week, at least two weeks, at least four weeks, at least eight weeks, at least twelve weeks, at least 24 weeks, or at least 48 weeks, while preferred subsequent treatment periods are at least 12 weeks, at least 24 weeks or at least 48 weeks. In some embodiments, the subject is a non-human animal with arthritis, which may be naturally present or

experimentally-induced. Preferred non-human subjects include CIA mice or rats with adjuvant-induced arthritis (AIA). In other embodiments, the subject is a human with arthritis.

In yet a further aspect, the present invention provides a method of treating a subject for an inflammatory joint disease with an IL-17A antagonist. This treatment method comprises
5 determining, in a first serum sample taken from the subject, the level of at least one joint destruction biomarker, administering the IL-17A antagonist to the subject according to a first dosing regimen during an initial treatment period, determining the level of the selected biomarker(s) in at least a second serum sample taken from the patient at the end of the initial treatment period, and comparing the levels of the biomarker in the first and second serum
10 samples.

If the level of the biomarker in the second serum sample is within a specified range, then the subject is treated with the IL-17A antagonist according to the first dosing regimen during at least one subsequent treatment period. However, if the level of the biomarker in the second serum sample is outside of the specified range, e.g., indicating that more aggressive
15 therapy may be necessary to achieve inhibition of joint destruction, then the subject is treated with the IL-17A antagonist according to a second dosing regimen during at least one subsequent treatment period, wherein the second dosing regimen comprises administering a total amount of the IL-17A antagonist during the subsequent treatment period that is greater than the total amount administered during the initial treatment period.

In one preferred embodiment of this treatment method, the specified range is the normal range, i.e., the range of serum levels of the biomarker found in a population of healthy, gender- and age-matched subjects. In another preferred embodiment, the specified range for the serum level of the biomarker is defined by a confidence interval of at least 80% of the mean serum level of the biomarker in a population of subjects with the inflammatory disease
20 who were treated with the same IL-17A antagonist according to the same dosing regimen for a time period equal to or longer than the initial treatment period, wherein the population exhibited inhibition of joint destruction following treatment with the IL-17A antagonist according to the first dosing regimen during a time period equal to or longer than the subsequent treatment period.
25

In one preferred embodiment, when the biomarker level in the second serum sample indicates that more aggressive anti-IL-17A therapy is required, the subject is treated with a greater total amount of the antagonist during the subsequent treatment period(s) by
30

administering the IL-17A antagonist at higher doses and/or at more frequent intervals than the doses and intervals employed during the initial treatment period.

In another preferred embodiment, the treatment method further comprises administering an IL-23 antagonist during each of the initial treatment and subsequent treatment periods, or during only a subsequent treatment period. The IL-23 antagonist may inhibit the expression of either subunit of the cytokine (IL-23p19 or p40), either subunit of the functional receptor (IL-23R or IL-12beta1), or may inhibit IL-23 signaling by directly or indirectly interacting with one or more of these polypeptides to prevent a functional ligand-receptor interaction. In some preferred embodiments, the IL-23 antagonist is an antibody or antibody fragment that binds to and inhibits the activity of either IL-23p19 or IL-23R. In one particularly preferred embodiment, the IL-23 antagonist is a monoclonal antibody that specifically binds to IL-23p19.

The invention also provides a kit for treating an inflammatory joint disease. The kit comprises a pharmaceutical composition of an IL-17A antagonist and reagents for measuring the level of at least one joint destruction biomarker in a serum sample taken from a subject.

The invention also provides a manufactured drug product for treating an inflammatory joint disease, which comprises a pharmaceutical formulation comprising an IL-17A antagonist and instructions for determining patient serum levels of at least one joint destruction biomarker before and during treatment with the IL-17A antagonist.

Yet another aspect of the invention is the use of an IL-17A antagonist for preparing a medicament for treating a patient having an inflammatory joint disease to inhibit joint destruction, wherein the patient has an abnormal serum level of at least one joint destruction biomarker after previous treatment with a different anti-rheumatic therapy. In a preferred embodiment, the medicament is for administering the IL-17A antagonist according to any of the treatment regimens described herein.

In each of the above described aspects of the invention, the IL-17A antagonist may inhibit the expression of IL-17A or IL-17RA or IL-17RC or may inhibit IL-17A signaling by directly or indirectly interacting with one or more of these polypeptides to prevent a functional ligand-receptor interaction. In some preferred embodiments, the IL-17A antagonist is an antibody or antibody fragment that binds to and inhibits the activity of either IL-17A, IL-17RA or IL-17RC. In one particularly preferred embodiment, the IL-17A antagonist is a monoclonal antibody that specifically binds to IL-17A. In other preferred embodiments, the IL-17A antagonist is a bispecific antibody that binds to and inhibits the activity of IL-23p19

and IL-17A; IL-23p19 and IL-17RA; IL-23R and IL-17A; IL-23R and IL-17RA, IL-23p19 and IL-17RC; or IL-23R and IL-17RC. In another particularly preferred embodiment, the IL-17A antagonist is a bispecific antibody that binds to and inhibits the activity of IL-23p19 and IL-17A.

5 In each of the above-described aspects of the invention, preferred joint destruction biomarkers are COMP, CTX-I, CTX-II, HC gp-39, OPG, RANKL, TRACP) isoform 5b and osteocalcin. Any one of these biomarkers or any combination of two or more, or all six, of these biomarkers may be employed. COMP, OPG and RANKL are more preferred biomarkers, with RANKL being the most preferred biomarker.

10 Preferred inflammatory joint diseases that may be treated using any of the above aspects of the invention are rheumatoid arthritis (RA), psoriatic arthritis (PsA) or ankylosing spondylitis (AS), with rheumatoid arthritis being a particularly preferred inflammatory joint disease.

Also, in each of the above-described aspects of the invention, the subject with the
15 inflammatory joint disease may be one that is an inflammatory nonresponder, an inflammatory responder, a moderate inflammatory responder, or a good inflammatory responder to the IL-17A antagonist or a different anti-rheumatic drug.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

20 Figure 1A shows the amino acid sequence of the light chain of humanized anti-IL-17A antibody 16C10 according to the present invention SEQ ID NO:1. CDRs are indicated.

Figure 1B shows amino acid sequence for the heavy chain of humanized anti-IL-17A antibody 16C10 according to the present invention SEQ ID NO: 2. CDRs are indicated.

25 Figures 2A-2D shows the effects of anti-IL-17A antibody treatments on pathology in the CIA mouse model of rheumatoid arthritis. Treatments include administration of anti-IL-17A antibody JL7.1D10 (at 28, 7, and 2 mg/kg) and administration of an isotype control (7 mg/kg).

Figure 2A presents visual disease severity score (DSS), a measure of visual paw swelling and redness, as a function of antibody treatment. Scoring is: 0 = paw appears the
30 same as control (untreated) paw; 1 = inflammation of one finger on a given paw; 2 = inflammation of two fingers or the palm of a given paw; 3 = inflammation of the palm and finger(s) of a given paw.

Figure 2B presents cartilage damage (by histopathology) as a function of antibody treatment. Scoring is: 0 = normal; 1 = minimal; 2 = mild; 3 = moderate; 4 = severe.

96

Figure 2C presents bone erosion (by histopathology) as a function of antibody treatment. Scoring is: 0 = normal; 1 = minimal; 2 = mild; 3 = moderate; 4 = severe.

Figure 2D presents bone erosion (by histopathology) for paws from CIA mice that scored 2 or 3 in visual DSS, i.e. highly inflamed paws. rIgG1 is an isotype control antibody.

5 Scoring is: 0 = normal; 1 = minimal; 2 = mild; 3 = moderate; 4 = severe.

Figures 3A-3B presents data showing the effect of an anti-IL-17A antibody on serum COMP levels in arthritic mice.

10 Figure 3A presents serum COMP levels in mice treated with isotype control or an anti-IL-17A antibody (JL7.1D10). The solid horizontal bar denotes the average serum COMP level in non-diseased animals (grey circles on left side of graphs) and the two dotted horizontal bars denotes +/- 2 standard deviations from the non-diseased mice average.

Figure 3AA presents serum COMP levels in non-diseased (normal) mice or in CIA mice treated weekly for five weeks with an isotype control or an anti-IL-17A antibody (JL7.1D10) at a dose of 28 mg/kg or 7 mg/kg.

15 Figure 3B presents serum COMP levels in non-diseased (un-manipulated) and severely arthritic mice treated with short term isotype control (rIgG1) or an anti-IL-17A antibody (JL7.1D10).

20 Figure 4 presents serum RANKL levels in arthritic mice who were untreated, treated with an isotype control, or treated with one of three doses of an anti-IL-17A antibody (JL7.1D10). The solid horizontal bar denotes the average serum COMP level in non-diseased animals (grey circles on left side of graphs) and the two dotted horizontal bars denotes +/- 2 standard deviations from the non-diseased mice average.

25 Figure 5 presents serum OPG levels in normal mice (grey circles) or in arthritic mice who were untreated (no dosing), treated with an isotype control (Rat IgG1), or treated with an anti-IL-17A antibody.

Figure 6 presents serum RANKL and OPG levels in normal mice (grey circles) or in severely arthritic mice following short-term exposure to an isotype control (rIgG1) or an anti-IL-17A antibody (JL7.1D10).

30 Figure 7 presents micro-CT X-rays of an un-inflamed mice paw, and of severely inflamed paws from arthritic mice treated with an isotype control antibody or an anti-IL-17A antibody.

Figure 8 presents serum TRACP levels in non-diseased (un-manipulated) and severely arthritic mice treated with long term isotype control (rIgG1) or an anti-IL-17A antibody (JL7.1D10).

Figure 9 presents serum osteocalcin levels in normal mice and in CIA mice treated with an anti-IL-17A antibody (JL7.1D10) or an isotype control antibody

Figure 10 shows the dynamic change in serum RANKL (left panel) and OPG (right panel) levels in a cohort of mice progressing through the mouse CIA mode, with horizontal lines indicating mean (unbroken line) +/- S.D. (broken lines) in un-manipulated healthy mice and antibody dosing denoted as arrowheads.

Figure 11 shows the serum RANKL concentration versus total animal DSS from individual normal or CIA mice at each of five weeks of treatment with a rat IgG1 isotype control antibody.

Figure 12 shows the serum OPG concentration versus total animal DSS from individual normal or CIA mice at each of five weeks of treatment with a rat IgG1 isotype control antibody.

Figure 13 presents the serum RANKL levels in individual CIA mice that were not treated or treated with five weekly subcutaneous doses of an isotype control antibody (rat IgG1) or an anti-IL-17A antibody (JL7.1D10) at 2, 7, or 28 mg/kg.

Figure 14 shows the serum OPG profiles for individual CIA mice that were not treated or treated with five weekly subcutaneous doses of 7 mg/kg of an isotype control antibody (rat IgG1) or 28 mg/kg of an anti-IL-17A antibody (JL7.1D10).

Figure 15 shows the thickness of paws in rats with adjuvant-induced arthritis (AIA) that were treated prior to adjuvant injection with an isotype antibody or with the indicated doses of an anti-rat IL-17A antibody (JL8.18E10).

Figure 16 illustrates the effect of anti-IL-17A or anti-TNF therapy on serum RANKL levels at days 14 and 25 following drug exposure in individual rats with established AIA.

DETAILED DESCRIPTION

I. Definitions.

So that the invention may be more readily understood, certain technical and scientific terms are specifically defined below. Unless specifically defined elsewhere in this document, all other technical and scientific terms used herein have the meaning commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs.

As used herein, including the appended claims, the singular forms of words such as “a,” “an,” and “the,” include their corresponding plural references unless the context clearly dictates otherwise.

“Abnormal” in the context of the serum level of a joint destruction biomarker means that the serum level is outside of the normal range for that biomarker.

“Ankylosing spondylitis” or “AS” is a form of chronic inflammation of the spine and the sacroiliac joints, which are located in the low back where the sacrum (the bone directly above the tailbone) meets the iliac bones (bones on either side of the upper buttocks). Chronic inflammation in these areas causes pain and stiffness in and around the spine. Over time, chronic spinal inflammation (spondylitis) can lead to a complete cementing together (fusion) of the vertebrae, a process referred to as ankylosis. Ankylosis leads to loss of mobility of the spine. Ankylosing spondylitis is also a systemic rheumatic disease, meaning it can affect other tissues throughout the body. Accordingly, it can cause inflammation in or injury to other joints away from the spine, as well as other organs, such as the eyes, heart, lungs, and kidneys.

“Antagonist” means any molecule that can prevent, neutralize, inhibit or reduce a targeted activity, i.e., the activity of a cytokine such as IL-17A, either *in vitro* or *in vivo*. Cytokine antagonists include, but are not limited to, antagonistic antibodies, peptides, peptide-mimetics, polypeptides, and small molecules that bind to a cytokine (or any of its subunits) or its functional receptor (or any of its subunits) in a manner that interferes with cytokine signal transduction and downstream activity. Examples of peptide and polypeptide antagonists include truncated versions or fragments of the cytokine receptor (e.g., soluble extracellular domains) that bind to the cytokine in a manner that either reduces the amount of cytokine available to bind to its functional receptor or otherwise prevents the cytokine from binding to its functional receptor. Antagonists also include molecules that prevent expression of any subunit that comprises the cytokine or its receptor, such as, for example, antisense oligonucleotides which target mRNA, and interfering messenger RNA, (see, e.g., Arenz and Schepers (2003) *Naturwissenschaften* 90:345-359; Sazani and 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). The inhibitory effect of an antagonist can be measured by routine techniques. For example, to assess the inhibitory effect on cytokine-induced activity, human cells expressing a functional receptor for a cytokine are treated with the cytokine and the expression of genes known to be activated or inhibited by that cytokine is

measured in the presence or absence of a potential antagonist. Antagonists useful in the present invention inhibit the targeted activity by at least 25%, preferably by at least 50%, more preferably by at least 75%, and most preferably by at least 90%, when compared to a suitable control.

5 "Antibody" refers to any form of antibody that exhibits the desired biological activity, such as inhibiting binding of a ligand to its receptor, or by inhibiting ligand-induced signaling of a receptor. Thus, "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers, but is not limited to, monoclonal antibodies (including full length monoclonal antibodies), polyclonal antibodies, and multispecific antibodies (*e.g.*, bispecific antibodies).

10 "Antibody fragment" and "antibody binding fragment" mean antigen-binding fragments and analogues of an antibody, typically including at least a portion of the antigen binding or variable regions (*e.g.* one or more CDRs) of the parental antibody. An antibody fragment retains at least some of the binding specificity of the parental antibody. Typically, an antibody fragment retains at least 10% of the parental binding activity when that activity is
15 expressed on a molar basis. Preferably, an antibody fragment retains at least 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% or 100% or more of the parental antibody's binding affinity for the target. Examples of antibody fragments include, but are not limited to, Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies; single-chain antibody molecules, *e.g.*, sc-Fv; and multispecific antibodies formed from antibody fragments. Engineered antibody variants are
20 reviewed in Holliger and Hudson (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1126-1136.

A "Fab fragment" is comprised of one light chain and the C_H1 and variable regions of one heavy chain. The heavy chain of a Fab molecule cannot form a disulfide bond with another heavy chain molecule.

25 An "Fc" region contains two heavy chain fragments comprising the C_H1 and C_H2 domains of an antibody. The two heavy chain fragments are held together by two or more disulfide bonds and by hydrophobic interactions of the CH3 domains.

A "Fab' fragment" contains one light chain and a portion of one heavy chain that contains the V_H domain and the C_H1 domain and also the region between the C_H1 and C_H² domains, such that an interchain disulfide bond can be formed between the two heavy chains
30 of two Fab' fragments to form a F(ab')₂ molecule.

A "F(ab')₂ fragment" contains two light chains and two heavy chains containing a portion of the constant region between the C_H1 and C_H² domains, such that an interchain

disulfide bond is formed between the two heavy chains. A $F(ab')_2$ fragment thus is composed of two Fab' fragments that are held together by a disulfide bond between the two heavy chains.

The "Fv region" comprises the variable regions from both the heavy and light chains, but lacks the constant regions.

5 A "single-chain Fv antibody (or "scFv antibody") refers to antibody fragments comprising the V_H and V_L domains of an antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Generally, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V_H and V_L domains which enables the scFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of scFv, see Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF
10 MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315. See also, International Patent Application Publication No. WO 88/01649 and U.S. Pat. Nos. 4,946, 778 and 5,260,203.

A "diabody" is a small antibody fragment with two antigen-binding sites. The fragments comprises a heavy chain variable domain (V_H) connected to a light chain variable
15 domain (V_L) in the same polypeptide chain (V_H - V_L or V_L - V_H). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, e.g., EP 404,097; WO 93/11161; and Holliger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448.

20 A "domain antibody fragment" is an immunologically functional immunoglobulin fragment containing only the variable region of a heavy chain or the variable region of a light chain. In some instances, two or more V_H regions are covalently joined with a peptide linker to create a bivalent domain antibody fragment. The two V_H regions of a bivalent domain antibody fragment may target the same or different antigens.

25 "Anti-rheumatic drug" is a drug used to treat rheumatoid arthritis. The major classes of anti-rheumatic drugs are described below.

"Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs" or "NSAIDs" are drugs with analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects – they reduce pain, fever and inflammation. NSAIDs are used to provide symptomatic relief in RA, but have a limited effect on the
30 progressive bone and cartilage loss associated with rheumatoid arthritis. NSAIDs include salicylates, arlyalknoic acids, 2-arylpropionic acids (profens), N-arylanthranilic acids (fenamic acids), oxicams, coxibs, and sulphonanilides. Common NSAIDs include: ibuprofen, naproxen and indomethacin.

“Corticosteroids” are synthetic analogs of cortisone and are used to reduce inflammation and suppress activity of the immune system. The most commonly prescribed are prednisone and dexamethasone.

“Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs” or “DMARDs” are drugs which influence the disease process itself. DMARDs, which are also known as remittive drugs, also have anti-inflammatory effects, and most were borrowed from the treatment of other diseases, such as cancer and malaria. DMARDs include chloroquine, hydroxychloroquine, methotrexate, sulfasalazine, cyclosporine, azathioprine and cyclophosphamide, azathioprine, sulfasalazine, penicillamine, and organic gold compounds such as aurothioglucose, gold sodium thiomalate and auranofin. DMARDs also include agents directed against pro-inflammatory cytokines and their receptors, such TNF- α inhibitors. Examples of TNF- antagonists that have been approved for treating RA, include Infliximab (Remicade®, Centocor, Malvern, PA), Etanercept (Enbrel®, Amgen, Thousand Oaks, CA), and Adalimumab (Humira®, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). IL-17A antagonists also would be classified as DMARDs.

“Slow-Acting Anti-rheumatic Drugs” or “SAARDs” are a special class of DMARDs and the effect of these drugs is slow acting and not so quickly apparent as that of the NSAIDs. Examples of SAARDs are hydroxychloroquine and aurothioglucose.

“Immunosuppressive cytotoxic drugs” or “immunosuppressive drugs” are anti-rheumatic drugs typically used for inflammatory joint diseases if prior treatment with NSAIDs and SAARDs had no effect. Examples of immunosuppressive drugs are: methotrexate, mechlorethamine, cyclophosphamide, chlorambucil, and azathioprine.

“Binding compound” refers to a molecule, small molecule, macromolecule, antibody, a fragment or analogue thereof, or soluble receptor, capable of binding to a specified target. “Binding compound” also may refer to any of the following that are capable of binding to the specified target: a complex of molecules (e.g., a non-covalent molecular complex); an ionized molecule; and a covalently or non-covalently modified molecule (e.g., modified by phosphorylation, acylation, cross-linking, cyclization, or limited cleavage). In cases where the binding compound can be dissolved or suspended in solution, “binding” may be defined as an association of the binding compound with a target where the association results in reduction in the normal Brownian motion of the binding compound.

“Binding composition” refers to a binding compound in combination with at least one other substance, such as a stabilizer, excipient, salt, buffer, solvent, or additive.

"Bispecific antibody" means an antibody that has two antigen binding sites having specificities for two different epitopes, which may be on the same antigen, or on two different antigens. Bispecific antibodies include bispecific antibody fragments. *See, e.g., Hollinger, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6444-48, Gruber, et al., J. Immunol. 152: 5368*
5 (1994).

"Consists essentially of" and variations such as "consist essentially of" or "consisting essentially of" as used throughout the specification and claims, indicate the inclusion of any recited elements or group of elements, and the optional inclusion of other elements, of similar or different nature than the recited elements, which do not materially change the basic or
10 novel properties of the specified dosage regimen, method, or composition. As a nonlimiting example, a cytokine or an antibody chain which consists essentially of a recited amino acid sequence may also include one or more amino acids that do not materially affect the properties of the cytokine or the antibody chain.

"Inflammatory joint disease" means any disease or condition in which (a)
15 inflammation is present in any joint and (b) the inflammation is part of an immune response that requires or is promoted by IL-17. Nonlimiting examples of inflammatory joint diseases include ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis:

"Inflammatory response" to an anti-rheumatic drug means a reduction in the signs and symptoms of inflammation, as measured using any accepted standard known in the art for the
20 inflammatory joint disease of interest. For example, comparing the number of tender and swollen joints between baseline and various time points during treatment is a typical way to assess joint status and response. In the American College of Rheumatology (ACR) joint count for RA (Felson *et al.* (1995) *Arthritis & Rheumatology* 38; 727-735), 68 joints are assessed for tenderness and 66 for swelling (the hip is not assessed for swelling). In the Disease Activity
25 Score (DAS) employed primarily in Europe, either a 44- or 28- joint count is used in RA. In PsA, most recent trials of anti-rheumatic drugs have used a 78 tender and 76 swollen joint count in order to accommodate the frequently involved distal interphalangeal and carpal metacarpal joints. In addition to the joint count, the ACR evaluation criteria include the following elements to comprise a composite score: patient global (on a visual analog scale
30 [VAS]), patient pain, physician global, Health Assessment Questionnaire (HAQ; a measure of function), and an acute-phase reactant (either C-reactive protein or sedimentation rate). An ACR 20 response would constitute a 20% improvement in tender and swollen joint count and a 20% improvement of at least 3 of the other 5 elements in the composite criteria. ACR 50

and 70 responses represent at least a 50% and 70% improvement of these elements. The ACR system only represents change, whereas the DAS system represents both current state of disease activity and change. The DAS scoring system uses a weighted mathematical formula, derived from clinical trials in RA. For example, the DAS 28 is $0.56(\sqrt{T28}) + 0.28(\sqrt{SW28}) + 0.70(\ln \text{ ESR}) + 0.014\text{GH}$ wherein T represents tender joint number, SW is swollen joint number, ESR is erythrocyte sedimentation rate, and GH is global health. Various values of the DAS represent high or low disease activity as well as remission, and the change and endpoint score result in a categorization of the patient by degree of response (none, moderate, good).

“Inflammatory responder” to an anti-rheumatic drug means a subject who, after 3 months of treatment with the drug, has at least a >20% improvement over baseline (e.g., pre-treatment) in ACR tender joint count and at least a >20% improvement over baseline in ACR swollen joint count.

“Good inflammatory responder” means a subject who has at least a 70% improvement over baseline in each of ACR tender and swollen joint counts after 3 months treatment with the drug.

“Moderate inflammatory responder” means a subject who has at least a 50% improvement over baseline in each of ACR tender and swollen joint counts after 3 months treatment with the drug.

“Inflammatory nonresponder” to an anti-rheumatic drug means a subject who, after 3 months of treatment with the drug, has either $\leq 20\%$ improvement over baseline in ACR tender joint count or $\leq 20\%$ improvement over baseline in ACR swollen joint count, or who fails to complete treatment with the anti-rheumatic drug for 3 months due to intolerable adverse effects or worsening of symptoms.

“Interleukin-12R betal” or “IL12RB1” means a single polypeptide chain consisting essentially of the sequence of human IL12RB1 as described in NCBI Protein Sequence Database Accession Numbers NP714912, NP005526 or naturally occurring variants thereof.

“Interleukin-17” or “IL-17” or “IL-17A” means a protein consisting of one or two polypeptide chains, with each chain consisting essentially of (1) the sequence of human IL17A as described in any of NCBI Protein Sequence Database Accession Numbers NP002181, AAH67505, AAH67503, AAH67504, AAH66251, AAH66252, or (2) naturally occurring variants of these sequences, including the mature form of the polypeptide chain, i.e., lacking

the signal peptide, or (3) the sequence of a non-human IL-17A, including mice IL-17A or rat IL-17A.

“IL-17R” or “IL-17RA” means a single polypeptide chain consisting essentially of the sequence of human IL-17RA as described in WO 96/29408 or in any of NCBI Protein Sequence Database Accession Numbers: NP 055154, Q96F46, CAJ86450, or naturally occurring variants of these sequences, including the mature form of the polypeptide chain, i.e., lacking the signal peptide.

“IL-17RC” means a single polypeptide chain consisting essentially of the sequence of human IL-17RC as described in WO 238764A2 or in any of NCBI Protein Sequence Database Accession Numbers NP703191, NP703190 and NP116121, or naturally occurring variants of these sequences, including the mature form of the polypeptide chain, i.e., lacking the signal peptide.

“Interleukin-23 (or “IL-23) means a protein consisting of two polypeptide chains. One chain consists essentially of the sequence of human IL23, subunit p19 (also known as IL23A) as described in any of NCBI Protein Sequence Database Accession Numbers NP057668, AAH67511, AAH66267, AAH66268, AAH66269, AAH667512, AAH67513 or naturally occurring variants of these sequences, including the mature form of the polypeptide chain, i.e., lacking the signal peptide. The other chain consists essentially of the sequence of human IL12, subunit p40 (also known as IL12B and IL23, subunit p40) as described in any of NCBI Protein Sequence Database Accession Numbers NP002178, P29460, AAG32620, AAH74723, AAH67502, AAH67499, AAH67498, AAH67501 or naturally occurring variants of these sequences, including the mature form of the polypeptide chain, i.e., lacking the signal peptide.

“Interleukin-23R” or “IL-23R” means a single polypeptide chain consisting essentially of the sequence of human IL23R as described in NCBI Protein Sequence Database Accession Number NP653302 or naturally occurring variants thereof, including the mature form of the polypeptide chain, i.e., lacking the signal peptide.

“Joint” means the area where two bones are attached for the purpose of motion of body parts. A joint is usually formed of fibrous connective tissue and cartilage. An articulation or an arthrosis is the same as a joint.

“Monoclonal antibody” or “mAb” means an antibody obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method.

“Normal range” in the context of serum biomarker levels refers to the range of serum levels of the biomarker found in a population of healthy, gender- and age-matched subjects. The minimal size of this healthy population may be determined using standard statistical measures, e.g., the practitioner could take into account the incidence of the disease in the general population and the level of statistical certainty desired in the results. Preferably, the normal range for serum levels of a joint destruction biomarker is determined from a population of at least five, ten or twenty subjects, more preferably from a population of at least forty or eighty subjects, and even more preferably from more than 100 subjects.

“Normalizes” or “Normalization” in the context of serum biomarker levels refers to an up or down change in the serum level of a biomarker following treatment with an IL-17A antagonist such that the changed serum level is closer to the normal range for that biomarker or preferably falls within the normal range. The levels of some serum markers of bone and cartilage metabolism or destruction are increased in arthritic subjects (e.g., COMP and RANKL); thus for such markers a normalization means that the serum level is decreased following treatment with an IL-17A antagonist, compared to the serum level prior to treatment. However, other serum markers of bone and cartilage metabolism or destruction are decreased in arthritic subjects (e.g., osteocalcin); thus, for such markers a normalization means that the serum level is increased following treatment with an IL-17A antagonist, compared to the serum level prior to such treatment.

“Parenteral administration” means an intravenous, subcutaneous, or intramuscular injection.

“Small molecule” means a molecule with a molecular weight that is less than 10 kD, typically less than 2 kD, and preferably less than 1 kD. Small molecules include, but are not limited to, inorganic molecules, organic molecules, organic molecules containing an inorganic component, molecules comprising a radioactive atom, synthetic molecules, peptide mimetics, and antibody mimetics. Peptide mimetics of antibodies and cytokines are known in the art. See, e.g., 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 and Sone (2003) *Biochem. J.* 371:603-608; U.S. Patent No. 6,326,482 issued to Stewart, *et al.*

“Psoriatic arthritis” or “PsA” is a chronic disease characterized by inflammation of the skin (psoriasis) and joints (arthritis). Psoriasis features patchy, raised, red areas of skin

inflammation with scaling and often affects the tips of the elbows and knees, the scalp, the navel, and around the genital areas or anus. Approximately 10% of patients who have psoriasis also develop an associated inflammation of their joints. Patients who have both inflammatory arthritis and psoriasis are diagnosed as having psoriatic arthritis. Psoriatic arthritis is a systemic rheumatic disease that can also cause inflammation in body tissues away from the joints and the skin, such as in the eyes, heart, lungs, and kidneys.

"Serum" means blood serum or blood plasma.

"Subject" means any animal. In some preferred embodiments, it will be readily apparent to the skilled artisan from the context that the subject is a research animal such as a rodent, including mice or rats with or without experimentally induced arthritis. In other preferred embodiments, it will be readily apparent to the skilled artisan that the subject is a human.

"Treat" or "Treating" means to administer a therapeutic agent, such as a composition containing any of the IL-17A antagonists described herein, internally or externally to a patient in need of the therapeutic agent. Typically, the agent is administered in an amount effective to prevent or alleviate one or more disease symptoms, or one or more adverse effects of treatment with a different therapeutic agent, whether by preventing the development of, inducing the regression of, or inhibiting the progression of such symptom(s) or adverse effect(s) by any clinically measurable degree. The amount of a therapeutic agent that is effective to alleviate any particular disease symptom or adverse effect (also referred to as the "therapeutically effective amount") may vary according to factors such as the disease state, age, and weight of the patient, and the ability of the therapeutic agent to elicit a desired response in the patient. Whether a disease symptom or adverse effect has been alleviated can be assessed by any clinical measurement typically used by physicians or other skilled healthcare providers to assess the severity or progression status of that symptom or adverse effect. When a therapeutic agent is administered to a patient who has active disease, a therapeutically effective amount will typically result in a reduction of the measured symptom by at least 5%, usually by at least 10%, more usually at least 20%, most usually at least 30%, preferably at least 40%, more preferably at least 50%, most preferably at least 60%, ideally at least 70%, more ideally at least 80%, and most ideally at least 90%. While an embodiment of the present invention (e.g., a treatment method or drug product) may not be effective in preventing or alleviating the target disease symptom(s) or adverse effect(s) in every patient, it should alleviate such symptom(s) or effect(s) in a statistically significant number of patients as

determined by any statistical test known in the art such as the Student's t-test, the χ^2 -test, the U-test according to Mann and Whitney, the Kruskal-Wallis test (H-test), Jonckheere-Terpstra-test and the Wilcoxon-test.

5 II. General

As described in more detail in the Examples below, the present invention is based on the discoveries that anti-IL-17A therapy in a mouse model of RA (1) inhibits bone erosion, even when the anti-IL-17A therapy did not have an apparent effect on inflammation and (2) decreases serum levels of several markers of cartilage and/or bone metabolism. These
10 discoveries have the following implications for anti-IL-17A therapy of human inflammatory joint diseases:

- patients whose outward signs of disease (e.g. tender and swollen joint counts, serum IL-6, serum CRP, acute phase reactants, HAQ, patient and physician global assessments, ACR20/50/70 composite scoring system) are not adequately being controlled by other anti-
15 rheumatic drugs may derive joint protective benefit from blocking IL-17A;

- patients treated with an IL-17A antagonist who derive little to no benefit as assessed by these outward signs of disease may still be achieving inhibition of joint destruction as assessed by X-ray (measure of bone erosion) or MRI (measure of synovial inflammation);

- patients having serum levels of disease markers that pronostically suggest the potential
20 for accelerated joint destruction (e.g., elevated serum levels of COMP, CTX-II, CTX-I, RANKL, OPG, TRACP, YKL-40, or other cartilage and/or bone destruction markers, or reduced serum levels of osteocalcin) may experience the most joint-preserving benefit from anti-IL-17A therapy, regardless of whether such therapy modulates the outward signs of disease; and

- short term modulation of the elevated levels of serum markers of bone and cartilage
25 destruction (e.g., COMP, CTX-I, CTX-II, HC gp-39, OPG and RANKL) or depressed serum makers of bone destruction (e.g., osteocalcin) can be used to assess whether IL-17A blockade holds long term promise as a joint protective therapy, i.e. as pharmacodynamic markers or surrogate markers for X-ray-based efficacy measures. Thus, the present invention provides
30 methods, kits and drug products that are directed to the use of joint destruction biomarkers to guide therapy with IL-17A antagonists.

Measurement of the serum level of a joint destruction biomarker employed in the present invention may be achieved using any technique known in the art. Assays for COMP,

CTX-I, CTX-II, HC gp-39, OPG and RANKL are either commercially available or described in the literature.

COMP assays: AnaMar Medical, Lund, Sweden (Crnkic, M., et al., *Arth. Res. Ther.* 2003; 5:R181-R185); AnaMar Medical, Lund, Sweden (Mundermann, A., et al., *Osteo and Cartilage* 2005; 13:34-38); AnaMar Medical, Lund, Sweden (Skoumal, M., et al., *Arth. Res. Ther.* 2004; 6:73-74); AnaMar Medical, Lund, Sweden (Skoumal Scand J. Rheum. 2003); AnaMar Medical, Lund, Sweden (Lindqvist, E., et al., *Ann. Rheum. Dis* 2005; 64:196-201); Lab Inhibition ELISA (Wisłowska, *Clin. Rheumatol* 2005; 24:278-284); Lab ELISA (Mansson, *J. Clin. Invest.* 1995); Lab ELISA (Senolt Physiological Res. 2007); Ana Mar Medical, Lund, Sweden (Morozzi, G., et al., *Clin Rheum* 2007); AnaMar Medical, Lund, Sweden (Andersson, M.L.E., et al., *Ann Rheum Dis* 2006; 65:1490-1494).

HC gp39 Assays: Quidel, US (Hetland, ACR2006); Lab assay (den Broeder, A.A., et al., *Ann Rheum Dis* 2002; 61:311-318); Lab RIA assay (Johansen, J.S., et al., *Rheumatology* 1999; 38:618-626).

RANKL Assays: AMGEN in-house ELISA (Geusens, P.P., et al., *Arth Rheum* 2006; 54(6):1772-1777); ELISA (Immun-diagnostik, Germany, *Vis Ard.bmjournals.com* 2006).

OPG Assays: Biomedica Medizinprodukte, Vienna, Austria (Geusens, *Arth Rheum* 2006; *supra*); ELISA (Immundiagnostik, Germany) (*Vis Ard.bmjournals.com* 2006); ELISA (Immunodiagnostik, Bensheim, Germany); (Valleala, H., et al., *Eur. J. Endocrinology* 2003; 148:527-530).

CTX-I Assays: CrossLaps ELISA (Osteometer Biotech, Herlev, Denmark) (Garnero, P., et al., *Arth Rheuma* 2002; 46(11):2847-2856); CrossLaps (Rosch, Mannheim, Germany) (Lange, U., et al., *Rheumatology* 2005; 44:1546-1548).

CTX-II Assays: CartiLaps ELISA (Osteometer Biotech, Herlev, Denmark) (Garnero, P., et al., *Arth Rheuma* 2002; *supra*); CartiLaps ELISA (Osteometer Biotech, Herlev, Denmark) (Garnero, *Arth Rheuma* 2002; 46:21-30); PC-Cartilaps (Nordic Biosciences Diagnostics, Herlev, Denmark) (Olsen, A.K., et al., *Osteoarth. and Cartilage* 2007; 15:335-342).

Antagonists useful in the present invention inhibit, block or neutralize IL-17A activity, which includes inhibiting IL-17A activity in promoting accumulation of neutrophils in a localized area and inhibiting IL-17A activity in promoting the activation of neutrophils (see, e.g., Kolls, J. et al. (2004) *Immunity* Vol. 21, 467-476). IL-17A can induce or promote the production of any of the following proinflammatory and neutrophil-mobilizing cytokines,

depending on the cell type: IL-6, MCP-1, CXCL8 (IL-8), CXCL1, CXCL6, TNF α , IL-1 β , G-CSF, GM-CSF, MMP-1, and MMP-13.

IL-17A antagonists useful in the present invention include a soluble receptor comprising the extracellular domain of a functional receptor for IL-17A. Soluble receptors can be prepared and used according to standard methods (see, e.g., Jones, *et al.* (2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1592:251-263; Prudhomme, *et al.* (2001) *Expert Opinion Biol. Ther.* 1:359-373; Fernandez-Botran (1999) *Crit. Rev. Clin. Lab Sci.* 36:165-224).

Preferred IL-17A antagonists for use in the present invention are antibodies or bispecific antibodies that specifically bind to, and inhibit the activity of, any of IL-17A, IL-17RA, IL-17RC, and a heteromeric complex comprising IL-17RA and IL-17RC. More preferably, the target of the IL-17A antagonist is IL-17A or IL-17RA. Particularly preferred IL-17A antagonists specifically bind to, and inhibit the activity of IL-17A. A particularly preferred IL-17A antagonist is a humanized monoclonal antibody which comprises a light chain having SEQ ID NO:1 and a heavy chain having SEQ ID NO:2.

Another preferred IL-17A antagonist for use in the present invention is a bispecific antibody, or bispecific antibody fragment, which also antagonizes IL-23 activity. Such bispecific antagonists specifically bind to, and inhibit the activity of, each member in any of the following combinations: IL-17A and IL-23; IL-17A and IL-23p19; IL-17A and IL-12p40; IL-17A and an IL-23R/IL12RB1 complex; IL-17A and IL-23R; IL-17A and IL12RB1; IL17RA and IL-23; IL-17RA and IL-23p19; IL-17RA and IL-12p40; IL-17RA and an IL-23R/IL12RB1 complex; IL-17RA and IL-23R; IL-17RA and IL12RB1; IL17RC and IL-23; IL-17RC and IL-23p19; IL-17RC and IL-12p40; IL-17RC and an IL-23R/IL12RB1 complex; IL-17RC and IL-23R; IL-17RC and IL12RB1; an IL-17RA/IL-17RC complex and IL-23; an IL-17RA/IL-17RC complex and IL-23p19; an IL-17RA/IL-17RC complex and IL-12p40; an IL-17RA/IL-17RC complex and an IL-23R/IL12RB1 complex; an IL-17RA/IL-17RC complex and IL-23R; and an IL-17RA/IL-17RC complex and IL12RB1. Preferred combinations targeted by bispecific antibodies used in the present invention are: IL-17A and IL-23; IL-17A and IL-23p19; IL17RA and IL-23; and IL-17RA and IL-23p19. A particularly preferred bispecific antibody specifically binds to, and inhibits the activity of, each of IL-17A and IL-23p19.

Preferred IL-23 antagonists are antibodies that bind to, and inhibit the activity of, any of IL-23, IL-23p19, IL-12p40, IL23R, IL12RB1, and an IL-23R/IL12RB1 complex. Another preferred IL-23 antagonist is an IL-23 binding polypeptide which consists essentially of the

extracellular domain of IL-23R, e.g., amino acids 1-353 of GenBankAAM44229, or a fragment thereof.

Antibody antagonists for use in the invention may be prepared by any method known in the art for preparing antibodies. The preparation of monoclonal, polyclonal, and humanized antibodies is described in Sheperd and Dean (eds.) (2000) *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, New York, NY; Kontermann and Dubel (eds.) (2001) *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, New York; Harlow and 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 and Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487-499; and U.S. Pat. No. 6,329,511 issued to Vasquez, *et al.*

Any antigenic form of the desired target can be used to generate antibodies, which can be screened for those having the desired antagonizing activity. Thus, the eliciting antigen may be a peptide containing a single epitope or multiple epitopes, or it may be the entire protein alone or in combination with one or more immunogenicity enhancing agents known in the art. To improve the immunogenicity of an antigenic peptide, the peptide may be conjugated to a carrier protein. The antigen may also be an isolated full-length protein, a cell surface protein (e.g., immunizing with cells transfected with at least a portion of the antigen), or a soluble protein (e.g., immunizing with only the extracellular domain portion of the protein). The antigen may be expressed by a genetically modified cell, in which the DNA encoding the antigen is genomic or non-genomic (e.g., on a plasmid).

A peptide consisting essentially of a region of predicted high antigenicity can be used for antibody generation. For example, regions of high antigenicity of human p19 occur at amino acids 16-28; 57-87; 110-114; 136-154; and 182-186 of GenBank AAQ89442 (gi:37183284) and regions of high antigenicity of human IL-23R occur at amino acids 22-33; 57-63; 68-74; 101-112; 117-133; 164-177; 244-264; 294-302; 315-326; 347-354; 444-473; 510-530; and 554-558 of GenBank AAM44229 (gi: 21239252), as determined by analysis with a Parker plot using Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD).

Any suitable method of immunization can be used. Such methods can include use of adjuvants, other immunostimulants, repeated booster immunizations, and the use of one or more immunization routes. Immunization can also be performed by DNA vector immunization, see, e.g., Wang, *et al.* (1997) *Virology* 228:278-284. Alternatively, animals

can be immunized with cells bearing the antigen of interest, which may provide superior antibody generation than immunization with purified antigen (Kaithamana, *et al.* (1999) *J. Immunol.* 163:5157-5164).

Preferred antibody antagonists are monoclonal antibodies, which may be obtained by a variety of techniques familiar to skilled artisans. Methods for generating monoclonal antibodies are generally described in Stites, *et al.* (eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (4th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, and references cited therein; Harlow and Lane (1988) ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL CSH Press; Goding (1986) MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2d ed.) Academic Press, New York, NY. Typically, splenocytes isolated from an immunized mammalian host are immortalized, commonly by fusion with a myeloma cell to produce a hybridoma. *See* Kohler and 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. Alternative methods of immortalization include transformation with Epstein Barr Virus, oncogenes, or retroviruses, or other methods known in the art. *See, e.g.,* Doyle, *et al.* (eds. 1994 and periodic supplements) CELL AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley and Sons, New York, NY. Colonies arising from single immortalized cells are screened for production of antibodies of the desired specificity, affinity and inhibiting activity using suitable binding and biological assays. For example, antibody to target binding properties can be measured, *e.g.,* by surface plasmon resonance (Karlsson, *et al.* (1991) *J. Immunol. Methods* 145:229-240; Neri, *et al.* (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:1271-1275; Jonsson, *et al.* (1991) *Biotechniques* 11:620-627) or by competition ELISA (Friguet, *et al.* (1985) *J. Immunol. Methods* 77:305-319; Hubble (1997) *Immunol. Today* 18:305-306).

Alternatively, one may isolate DNA sequences which encode a monoclonal antibody or a binding fragment thereof by screening a DNA library from human B cells, *see e.g.,* Huse, *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281. Other suitable techniques involve screening phage antibody display libraries. *See, e.g.,* Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989); and Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546 (1989); Clackson *et al.* (1991) *Nature* 352: 624-628 and Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597; Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731.

Preferred monoclonal antibodies for use in the present invention are "chimeric" antibodies (immunoglobulins) in which the variable domain is from the parental antibody generated in an experimental mammalian animal, such as a rat or mouse, and the constant domains are obtained from a human antibody, so that the resulting chimeric antibody will be

less likely to elicit an adverse immune response in a human subject than the parental mammalian antibody. More preferably, a monoclonal antibody used in the present invention is a "humanized antibody", in which all or substantially all of the hypervariable loops (e.g., the complementarity determining regions or CDRs) in the variable domains correspond to those of a non-human immunoglobulin, and all or substantially all of the framework (FR) regions in the variable domains are those of a human immunoglobulin sequence. A particularly preferred monoclonal antibody for use in the present invention is a "fully human antibody", e.g., an antibody that comprises human immunoglobulin protein sequences only. A fully human antibody may contain carbohydrate chains from the cell species in which it is produced, e.g., if produced in a mouse, in a mouse cell, or in a hybridoma derived from a mouse cell, a fully human antibody will typically contain murine carbohydrate chains.

Monoclonal antibodies used in the present invention may also include camelized single domain antibodies. See, e.g., Muyldermans *et al.* (2001) *Trends Biochem. Sci.* 26:230; Reichmann *et al.* (1999) *J. Immunol. Methods* 231:25; WO 94/04678; WO 94/25591; U.S. Pat. No. 6,005,079.

The antagonistic antibodies used in the present invention may have modified (or blocked) Fc regions to provide altered effector functions. See, e.g., U.S. Pat. No. 5,624,821; WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702. Alterations of the Fc region include amino acid changes (substitutions, deletions and insertions), glycosylation or deglycosylation, and adding multiple Fc. Changes to the Fc can alter the half-life of therapeutic antibodies, enabling less frequent dosing and thus increased convenience and decreased use of material. See Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731 at 734-35.

The antibodies may also be conjugated (e.g., covalently linked) to molecules that improve stability of the antibody during storage or increase the half-life of the antibody *in vivo*. Examples of molecules that increase the half-life are albumin (e.g., human serum albumin) and polyethylene glycol (PEG). Albumin-linked and PEGylated derivatives of antibodies can be prepared using techniques well known in the art. See, e.g., Chapman, A.P. (2002) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:531-545; Anderson and Tomasi (1988) *J. Immunol. Methods* 109:37-42; Suzuki, et al. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 788:248-255; and Brekke and Sandlie (2003) *Nature Rev.* 2:52-62).

Bispecific antibodies that antagonize both IL-17 and IL-23 activity can be produced by any technique known in the art. For example, bispecific antibodies can be produced recombinantly using the co-expression of two immunoglobulin heavy chain/light chain pairs.

See, e.g., Milstein et al. (1983) *Nature* 305: 537-39. Alternatively, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. See, e.g., Brennan, et al. (1985) *Science* 229: 81. These bifunctional antibodies can also be prepared by disulfide exchange, production of hybrid-hybridomas (quadromas), by transcription and translation to produce a single polypeptide chain embodying a bispecific antibody, or transcription and translation to produce more than one polypeptide chain that can associate covalently to produce a bispecific antibody. The contemplated bispecific antibody can also be made entirely by chemical synthesis. The bispecific antibody may comprise two different variable regions, two different constant regions, a variable region and a constant region, or other variations.

Antibodies used in the present invention will usually bind with at least a K_D of about 10^{-3} M, more usually at least 10^{-6} M, typically at least 10^{-7} M, more typically at least 10^{-8} M, preferably at least about 10^{-9} M, and more preferably at least 10^{-10} M, and most preferably at least 10^{-11} M (see, e.g., 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.* (Suppl.) 9:3982s-3990s).

IL-17A antagonists and IL-23 antagonists are typically administered to a patient as pharmaceutical compositions in which the antagonist is admixed with a pharmaceutically acceptable carrier or excipient, see, e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences* and *U.S. Pharmacopeia: National Formulary*, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). The pharmaceutical composition may be formulated in any manner suitable for the intended route of administration. Examples of pharmaceutical formulations include lyophilized powders, slurries, aqueous solutions, suspensions and sustained release formulations (see, e.g., Hardman, et al. (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, NY; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams, and Wilkins, New 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 and Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY).

The route of administration will depend on the properties of the antagonist or other therapeutic agent used in the pharmaceutical composition. Preferably, pharmaceutical compositions containing IL-17A antagonists and IL-23 antagonists are administered



systemically by oral ingestion, injection or infusion by intravenous, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intracerebrospinal, intralesional, or pulmonary routes, or by sustained release systems such as implants. Injection of gene transfer vectors into the central nervous system has also been described (see, e.g., 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; U.S. Pat. Nos. 6,350,466 and 6,316,024).

The pharmaceutical compositions used in the invention may be administered according to any treatment regimen that ameliorates or prevents joint destruction. Selecting the treatment regimen will depend on several composition-dependent and patient-dependent factors, including but not limited to the half-life of the antagonist, the severity of the patient's symptoms, and the type or length of any adverse effects. Preferably, an administration regimen maximizes the amount of therapeutic agent delivered to the patient consistent with an acceptable level of side effects. Guidance in selecting appropriate doses of therapeutic antibodies and small molecules is available (see, e.g., Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New 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).

Biological antagonists such as antibodies may be provided by continuous infusion, or by doses at intervals of, e.g., once per day, once per week, or 2 to 7 times per week, once every other week, or once per month. A total weekly dose for an antibody is generally at least 0.05 µg/kg body weight, more generally at least 0.2 µg/kg, most generally at least 0.5 µg/kg, typically at least 1 µg/kg, more typically at least 10 µg/kg, most typically at least 100 µg/kg, preferably at least 0.2 mg/kg, more preferably at least 1.0 mg/kg, most preferably at least 2.0 mg/kg, optimally at least 10 mg/kg, more optimally at least 25 mg/kg, and most optimally at least 50 mg/kg (see, e.g., 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). The desired

dose of a small molecule therapeutic, e.g., a peptide mimetic, natural product, or organic chemical, is about the same as for an antibody or polypeptide, on a moles/kg basis. Determination of the appropriate dose is made by the clinician, e.g., using parameters or factors known or suspected in the art to affect treatment or predicted to affect treatment.

- 5 Generally, the beginning dose is an amount somewhat less than the optimum dose and the dose is increased by small increments thereafter until the desired or optimum effect is achieved relative to any negative side effects.

10 In one preferred embodiment, the IL-17A antagonist is a humanized monoclonal antibody which comprises a light chain having SEQ ID NO:1 and a heavy chain having SEQ ID NO:2. This humanized Mab is preferably administered subcutaneously twice a week, weekly, biweekly, or monthly at a dose of between 10 mg and 2,000 mg, more preferably once or twice monthly between 20 mg and 400 mg, and even more preferably once monthly at a dose of between 40 mg and 100 mg. In one preferred embodiment, this humanized Mab is administered according to a dosage regimen that achieves serum concentrations of 0.1-100
15 $\mu\text{g/mL}$, or more preferably 1-10 $\mu\text{g/mL}$.

20 Treatment regimens using IL-17A antagonists will typically be determined by the treating physician and will take into account the patient's age, medical history, disease symptoms, and tolerance for different types of medications and dosing regimens. Generally the treatment regimen is designed to suppress the overly aggressive immune system, allowing the body to eventually re-regulate itself, with the result often being that after the patient has been kept on systemic medications to suppress the inappropriate immune response for a finite length of time (for example, one year), medication can then be tapered and stopped without recurrence of the autoimmune attack. Sometimes resumption of the attack does occur, in which case the patient must be re-treated.

25 Thus, in some cases, the physician may prescribe the patient a certain number of doses of the IL-17A antagonist to be taken over a prescribed time period, after which therapy with the antagonist is discontinued. Preferably, after an initial treatment period in which one or more of the acute symptoms of the disease disappear, the physician will continue the antagonist therapy for some period of time, in which the amount and/or frequency of
30 antagonist administered is gradually reduced before treatment is stopped.

The present invention also contemplates treatment regimens in which an IL-17A antagonist is used in combination with an IL-23 antagonist. Such regimens may be especially useful in treating the acute phase of the inflammatory joint disease, in which the IL-17A

antagonist inhibits the activity of existing Th₁₇ cells, while the IL-23 antagonist prevents the generation of new Th₁₇ cells. Such combination therapy may provide effective treatment using a lower dose of the IL-17A antagonist and/or administering the IL-17A antagonist for a shorter period of time. As symptoms ameliorate, therapy with the IL-17A antagonist is preferably discontinued, while administration of the IL-23 antagonist is continued to prevent generation of new autoreactive Th₁₇ cells that could lead to recurrence of the disease. The two antagonists may be administered at the same time in a single composition, or in separate compositions. Alternately, the two antagonists may be administered at separate intervals. Different doses of the antagonists may also be used. Similarly, an anti- IL-17A/IL-23 bispecific antibody may also be administered during the acute phase and gradually withdrawn, followed by treatment with anti-IL-23 antibody to maintain repression of the disease.

The treatment regimen may also include use of other anti-rheumatic drugs or other therapeutic agents, to ameliorate one or more symptoms of the inflammatory joint disease or to prevent or ameliorate adverse effects from the antagonist therapy. Examples of therapeutic agents that have been used to treat symptoms of inflammatory joint diseases are NSAIDs and DMARDs.

In any of the therapies described herein in which two or more different therapeutic substances are used (e.g., an IL-17A antagonist and an IL-23 antagonist, or an IL-17A antagonist and a different anti-rheumatic drug), it will be understood that the different therapeutic substances are administered in association with each other, that is, they may be administered concurrently in the same pharmaceutical composition or as separate compositions or the substances may be administered at separate times, and in different orders.

The effectiveness of the IL-17A antagonist therapy for inhibiting joint destruction in a particular patient can be determined using diagnostic measures such as reduction or occurrence of inflammatory symptoms (e.g., swollen and tender joint counts), patient assessment of pain; patient and evaluator global assessment of disease activity and other peripheral manifestations of underlying joint pathology. Diagnostic measurements of a subject to be treated or treated according to the invention can be compared to data obtained from a control subject or control sample, which can be provided as a predetermined value, e.g., acquired from a statistically appropriate group of control subjects.

EXAMPLE 1

NHDF Assay for Anti-IL-17A Antibodies

The ability of anti-IL-17A antibodies useful in the present invention to block the biological activity of IL-17A is measured by monitoring rhIL-17A-induced expression of IL-6 in a normal human (adult) dermal fibroblast (NHDF) primary cell line. Briefly, various concentrations of an anti-IL-17A antibody to be assayed are incubated with rhIL-17A, and the resulting mixture is then added to cultures of NHDF cells. IL-6 production is determined thereafter as a measure of the ability of the antibody in question to inhibit IL-17A activity. A more detailed protocol follows.

A series two-fold dilutions of anti-IL-17A antibodies of interest are prepared (in duplicate) starting with a stock solution at 40 µg/ml. A stock solution of rhIL-17A is prepared at 120 ng/ml. Seventy µl of the rhIL-17A stock solution is mixed with 70 µl of the anti-IL-17A antibody dilutions in wells of a microtiter plate and incubated at room temperature for 20 minutes. One hundred µl of each of these mixtures is then added to wells of a microtiter plate that had been seeded with 1×10^4 NHDF cells/well (100 µl) the previous night and allowed to incubate at 37°C. NHDF cells (passage 4) were obtained from Cambrex BioScience (Baltimore, Maryland, USA). The resulting final concentration of rhIL-17A is 30 ng/ml (1 nM), and the antibodies range downward in two-fold intervals from 10 µg/ml. Plates are incubated at 37°C for 24 hours, followed by harvesting of the supernatant and removal of 50 µl for use in an IL-6 ELISA.

The ELISA for detection of human IL-6 is performed as follows. Reagents are generally from R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA). An hIL-6 capture antibody (50 µl/well of a 4 µg/ml solution) is transferred to wells of a microtiter plate, which is sealed and incubated overnight at 4°C. The plate is washed three times, and then blocked with 100 µl/well of blocking buffer for 1 hour or more. The plate is then washed again three times. Experimental samples (50 µl of the culture supernatant) and controls (serial dilutions of IL-6 protein) are added to the wells in 50 µl and incubated for two hours. Plates are washed three times, and 50 µl/well of a biotinylated anti-IL-6 detection antibody (300 ng/ml) is added. The plates are incubated at room temperature for two hours, washed three times, and 100 µl/well of streptavidin HRP is added and incubated for 20 minutes. The plate is washed again, ABTS (BioSource, Carlsbad, California, USA) is added (100 µl/well), and incubated for 20 minutes. Stop solution is added (100 µl/well) and the absorbance at 405nm is measured.

The IC50 for an anti-IL-17A antibody of interest is the concentration of antibody required to reduce the level of rhIL-17A-induced IL-6 production to 50% of the level observed in the absence of any added anti-IL-17A antibody.

EXAMPLE 2

Foreskin Fibroblast Assay Anti-IL-17A Antibodies

The ability of anti-IL-17A antibodies useful in the present invention to block the biological activity of IL-17A is measured by monitoring rhIL-17A-induced expression of IL-6 in HS68 foreskin fibroblast cell line. Reduced production of IL-6 in response to rhIL-17A is used as a measure of blocking activity by anti-IL-17A antibodies useful in the present invention.

Analysis of the expression of IL-17RC (an IL-17A receptor) in a panel of fibroblast cell lines identified the human foreskin fibroblast cell line HS68 (ATCC CRL1635) as a potential IL-17A responsive cell line. This was confirmed by indirect immunofluorescence staining with polyclonal goat anti-human IL-17R antibody (R&D Systems, Gaithersburg, Maryland, USA) followed by phycoerythrin (PE)-F(ab')₂ donkey anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch, Inc., West Grove, Pennsylvania, USA), and analyzing the PE immunofluorescence signal on a flow cytometer (FACScan, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA). As further validation of the model, IL-17A (both adenovirus-derived rhIL-17A and commercially available *E. coli*-derived IL-17A, R&D Systems) induced a dose-responsive induction of IL-6 in the HS68 cells with an EC50 of 5–10 ng/ml, which induction was blocked by pre-incubation with commercial polyclonal and monoclonal anti-IL-17A antibodies (R&D Systems).

The IL-17A inhibition assay is performed as follows. A confluent T-75 flask of HS68 cells (approximately 2×10^6 cells) is washed with Dulbecco's PBS without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ and then incubated with 5 ml of cell dissociation medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) for 2–5 minutes at 37°C in an incubator at 5% CO₂. Cells are then harvested with 5 ml of tissue culture (TC) medium and centrifuged for 5 minutes at 1000 rpm. TC medium is Dulbecco's Modified Eagle's Medium (with glutamine), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Hyclone), 10 mM Hepes, 1mM sodium pyruvate, penicillin, and streptomycin. Cells are resuspended in 2 ml TC medium, diluted 1:1 with trypan blue and counted. Cell concentrations are adjusted to 1×10^5 cells/ml in TC medium, and 0.1 ml/well is aliquoted into the wells of a flat-bottom plate containing 0.1 ml TC medium. Cells are grown overnight and the supernatant is aspirated and cells are washed with 0.2 ml of fresh TC medium.

Anti-IL-17A antibodies to be assayed are serially diluted in two-fold or 3-fold steps to give a series of stock solutions that can be used to create final antibody concentrations of 1 to 0.001 µg/ml in the IL-17A inhibition assay. A rat IgG control is used in each assay, as well as media-only samples, as controls to measure spontaneous IL-6 production in HS68 cells. The TC medium is aspirated from the wells of the plate containing the HS68 cells. Aliquots of the various concentrations of anti-IL-17A antibody (0.1 ml of each) are pre-incubated in the wells with the HS68 cells 37°C for 5 minutes prior to addition of 0.1 ml of 20 ng/ml rhIL-17A, to give a final concentration of rhIL-17A of 10 ng/ml (approximately 330 pM of IL-17A dimer). Cells are incubated 24 hours at 37°C, and supernatants (50 – 100 µl) are harvested and assayed for IL-6, for example using a human IL-6 ELISA kit from Pharmingen (OptEIA – BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA).

EXAMPLE 3

Ba/F3-hIL-17Rc-mGCSFR Proliferation Assay

The ability of the anti-IL-17A antibodies useful in the present invention to block the biological activity of IL-17A is measured by monitoring rhIL-17A-induced proliferation of a cell line engineered to proliferate in response to IL-17A stimulation. Specifically, the Ba/F3 cell line (IL-3 dependent murine pro-B cells) was modified to express a fusion protein comprising the extracellular domain of a human IL-17A receptor (hIL-17RC) fused to the transmembrane domain and cytoplasmic region of mouse granulocyte colony-stimulating factor receptor (GCSFR). The resulting cell line is referred to herein as Ba/F3 hIL-17Rc-mGCSFR. Binding of homodimeric IL-17A to the extracellular IL-17RC domains causes dimerization of the hIL-17Rc-mGCSFR fusion protein receptor, which signals proliferation of the Ba/F3 cells via their mGCSFR cytoplasmic domains. Such cells proliferate in response to IL-17A, providing a convenient assay for IL-17A antagonists, such as anti-IL-17A antibodies.

The sensitivity of the Ba/F3-hIL-17Rc-mGCSFR proliferation assay to IL-17A stimulation makes it possible to perform experiments at relatively low concentrations of rhIL-17A (e.g. 3 ng/ml, 100 pM) compared with other assays, while still maintaining a robust and readily measurable proliferative response. This means that lower concentrations of anti-IL-17A antibodies are required to achieve a molar excess over rhIL-17A in the assay. Experiments performed at lower antibody concentrations make it possible to discriminate between high affinity antibodies that might otherwise be indistinguishable (i.e. experiments can be performed closer to the linear range in the antibody-IL-17A binding curve, rather than in the plateau).

EXAMPLE 4

Treatment of Collagen-Induced Arthritis Using Anti-IL-17A Antibodies

Collagen-induced arthritis (CIA) is a widely accepted mouse model for rheumatoid arthritis in humans. Rat anti-IL-17A antibody JL7.1D10, which binds to mouse IL-17A with high affinity, was administered to mice expressing CIA to assess the ability of anti-IL-17A therapy to treat rheumatoid arthritis.

The procedure was as follows. On Day 0 male B10.RIII mice were immunized intradermally at the tail base with bovine type II collagen emulsified in Complete Freund's Adjuvant. On Day 21 mice were challenged intradermally with bovine type II collagen emulsified in Incomplete Freund's Adjuvant delivered at the tail base. When the first sign of severe arthritis in the immunized group occurred (post-Day 21), all remaining immunized mice were randomized to the various treatment groups. Animals were treated with either 800 µg, 200 µg, or 50 µg of anti-IL-17A antibody JL7.1D10; 200 µg isotype control antibody; or diluent. JL7.1D10 is a surrogate, neutralizing, very high affinity rat antibody specific for mouse IL-17A (and human IL-17A) (hereinafter 1D10). Treatments were given subcutaneously on the first day of disease onset in the immunized mice, and then weekly four more times. Mice were sacrificed at day 35 and paws were fixed in 10% neutral-buffered formalin for tissue processing and sectioning. Paws were analyzed by a pathologist for the following histopathology parameters: reactive synovium, inflammation, pannus formation, cartilage destruction, bone erosion, and bone formation. Each parameter was graded using the following disease scale: 0 = no disease; 1 = minimal, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = severe. In addition paws were assessed using visual disease severity score (DSS), which measures swelling and redness on a scale of 0 to 3, with 0 being a normal paw, 1 being inflammation of one finger on the paw, 2 being inflammation of two fingers or the palm of that paw, and 3 being inflammation of the palm and finger(s) of the paw. Scores of 2 and 3 are referred to herein as severely or highly inflamed paws.

Results are presented at Figs. 2A – 2C. Each data point represents one paw, rather than an average for all four paws for an animal or an average over all animals. Reduction in the number of paws showing high pathology scores was statistically significant by three measures of pathology (visual DSS - paw swelling and redness, cartilage damage and bone erosion) with higher anti-IL-17A 1D10 concentrations tested (28 and 7 mg/kg). Results with the lowest concentration (2 mg/kg) were statistically significant for bone erosion and reduced for visual DSS and cartilage damage. Similar benefits were observed in reduction of

production of cartilage degradative enzymes within inflamed paws (matrix metalloproteases MMP-2, MMP-3, MMP-13).

Visual evaluation of paw inflammation, however, may underestimate the therapeutic benefit of anti-IL-17A treatment of CIA mice, e.g. decreased bone erosion. In other experiments, highly inflamed paws (DSS scores of 2 or 3) from CIA mice were analyzed for bone erosion using histopathology or micro-computed tomography (micro-CT). This study was possible because even though anti-IL-17A-treated animals had drastically reduced percentages of highly inflamed paws (see, e.g., FIG. 2A), there remained a number of highly inflamed paws, and it was possible to compare highly inflamed paws (DSS = 2 or 3) from all treatment groups, including the no-antibody controls. FIG. 2D shows a plot of bone erosion for highly inflamed paws from diluent treated, isotype control (rIgG1) treated, and anti-IL-17A antibody treated animals. Bone erosion, as measured by histopathology, was significantly reduced in paws from animals treated with anti-IL-17A when compared with no-antibody controls, despite their similar DSS scores. The results suggest that sparing of bone erosion may be achieved with anti-IL-17A treatment even in paws where there is no apparent improvement in inflammation as measured by DSS score.

Similar results were obtained when micro-CT was used to measure bone mineral density (BMD) for joints in highly inflamed paws in CIA mice. Table 1 provides BMD for paws with disease severity scores of 0 or 3 from CIA animals treated with either anti-IL-17A antibody 1D10 or an isotype control (25D2). Even for joints with the same visual disease severity, 1D10 antibody treated mice had only approximately half the decrease in bone mineral density observed with isotype control treated animals.

TABLE 1
Bone Density for Joints in CIA Mice

Treatment	DSS	BMD (mg/cc)
25D2	3	95
25D2	3	108
1D10	3	288
1D10	3	299
1D10	0	502
1D10	0	480

As with bone erosion, cartilage destruction and pannus formation (proliferation of the synovial lining forming excessive folds of inflamed tissue) were also reduced in 1D10-treated CIA mice. Histopathology showed that anti-IL-17A antibody treatment not only reduced the number of paws showing severe pathology, but also reduced pathology in paws that appeared equally inflamed based on visual inspection (DSS scores of 2 and 3) when compared with diluent or isotype treated controls.

The observation that treatment with an anti-IL-17A antibody significantly reduced bone erosion in the CIA model of joint inflammation suggests that such therapy may be useful in preventing one of the most debilitating and irreversible effects of RA in humans. In addition, the observation that bone erosion is reduced even in highly inflamed paws suggests that simple visual assessment of joint inflammation may not accurately measure therapeutic efficacy. Direct or indirect measurement of bone erosion may be necessary to track the effects of therapeutic treatments. Direct methods include, but are not limited to, standard 2-D X-ray detection, computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), ultrasound (US), and scintigraphy. See, e.g., Guerrazi *et al.* (2004) *Semin. Musculoskelet. Radiol.* 8(4):269-285. Indirect methods include the joint destruction biomarkers described herein.

EXAMPLE 5

Modulation of Serum COMP Levels in CIA Mice by Anti-IL-17A Therapy

The CIA mice model of arthritis was used to assess the effect of antibody 1D10 on serum levels of COMP, which is a non-collagenous protein incorporated into the cartilage matrix and is released into the synovial fluid and serum following cartilage proteolysis. Synovial fluid and serum COMP can also arise via de novo synthesis (i.e. un-related to cartilage destruction).

B10.RIII mice were immunized and boosted with type II collagen. After the first mice in the cohort of immunized/boosted mice developed a severely inflamed paw, all mice were randomized to receive therapy. Isotype or rat anti-mouse antibody 1D10 were delivered SC weekly for 5 weeks. Mice were bleed prior to the 2nd, 3rd, 4th, and 5th dose and then at sacrifice. Un-manipulated mice were bled to determine the normal range of serum COMP in the absence of disease. Serum COMP levels in CIA mice were measured using a commercial animal COMP ELISA (MD Biosciences, St. Paul, Minnesota).

The results are shown in Figure 3A: the solid horizontal bar denotes the average serum COMP in non-diseased animals (grey circles on left of graphs) and the two dotted

horizontal bars denotes $\pm$ 2 standard deviations from the non-diseased mice average. Note the one outlier non-diseased mouse that significantly pulls the dotted horizontal bars away from the average.

The results from this experiment show that arthritic mice have elevated serum COMP levels compared to the range of serum COMP levels seen in non-arthritic mice and that exposure to an anti-IL-17A antibody decreased the elevated serum COMP levels in the mice primed to get CIA. These decreased COMP levels correlated with reduced cartilage destruction as evidenced by joint histology data obtained from the same experiment using standard histological methods (data not shown).

To evaluate the dose-dependence of anti-IL-17A therapy on serum COMP levels, a second experiment was performed as described above, except that the weekly dose of anti-IL-17A antibody 1D10 was 28 mg/kg, 7 mg/kg or 2 mg/kg. No change in COMP levels were observed with the 2 mg/kg dose; however, a trend towards decreased COMP levels was observed in the CIA mice treated with either of the two higher doses, as shown in Figure 3AA.

The effect of short term anti-IL-17A therapy on serum COMP levels was investigated in severely arthritic mice. B10.RIII mice were immunized and boosted with type II collagen. Each mouse was examined and treated with a single dose of isotype (rat IgG1) or antibody 1D10 (28 mg/kg) when it exhibited a severely inflamed paw. Mice were sacrificed seven days after antibody treatment. Un-manipulated mice were bled to determine the normal range of serum COMP in the absence of disease. The results are shown in Figure 3B. 1D10 treated mice trended to reduced serum COMP after 7 days of drug exposure; therefore, longer drug exposure may be needed to bring COMP levels down to un-manipulated levels.

The results of these experiments on mice primed to get CIA and severely arthritic mice are consistent with the ability of 1D10 to inhibit cartilage destruction as measured by standard histological methods. Thus, the cartilage preserving properties of IL-17A antagonism correlated with this serum marker of cartilage destruction and serum COMP is likely to be useful as a biomarker of the effect of anti-IL-17A therapy on joint destruction in human RA patients.

EXAMPLE 6

Modulation of Serum RANKL Levels in CIA Mice by Anti-IL-17A Therapy

The CIA mice model of arthritis was used to assess the effect of anti-IL-17A therapy on serum levels of RANKL, which is a cell-surface molecule expressed by activated T-cells, synoviocytes, and osteoblasts that regulates the developmental transition of pre-osteoclasts into mature osteoclasts. Serum RANKL is elevated in human RA.

5 B10.RIII mice were immunized and boosted with type II collagen. After the first mice in the cohort of immunized/boosted mice developed a severely inflamed paw, all mice were randomized to receive therapy. Vehicle, isotype antibody, or one of three different doses of antibody 1D10 were delivered SC weekly for 5 weeks. Mice were bled prior to the 2nd, 3rd, 4th, and 5th dose and then at sacrifice. Un-manipulated mice were bled to determine the
10 normal range of serum RANKL in the absence of disease. The results are shown in Figure 4: the solid horizontal bar denotes the average serum RANKL level in non-diseased animals (grey circles on left of graphs) and the two dotted horizontal bars denotes +/- 2 standard deviations from the non-diseased mice average.

Non-diseased mice (solid bar, grey circles) have detectable serum RANKL levels, but
15 arthritic mice have elevated levels (vehicle). Exposure to antibody 1D10 decreased the elevated serum RANKL levels in the mice primed to get CIA compared to isotype (Rat IgG1), with the highest dose (28 mg/kg) bringing the serum RANKL level for each animal within the normal range. Significantly, this dose of 1D10 is also effective at inhibiting bone erosion as measured by standard histological methods. Thus, since the bone preserving properties of IL-
20 17A antagonism correlated with this serum marker of bone destruction, RANKL is likely to be useful as a biomarker of the effect of anti-IL-17A therapy on joint destruction in human RA patients. These results also suggest that endogenous IL-17A plays a major role in RANKL production in CIA mice, and that inhibition of RANKL expression by the anti-IL-17A 1D10 antibody may partially explain why this antibody inhibited joint bone erosion, even in the few
25 paws that became severely swollen.

EXAMPLE 7

Modulation of Serum OPG Levels in CIA Mice by Anti-IL-17A Therapy

The CIA mice model of arthritis was used to assess the effect of anti-IL-17A therapy on serum levels of OPG, which is a soluble factor that binds to cell-surface RANKL
35 and soluble RANKL and antagonizes RANKL from delivering the developmental signal to

pre-osteoclasts. OPG is elevated in human RA serum, as is RANKL, which may reflect the organism's attempt to diminish the elevated RANKL's effects.

B10.RIII mice were immunized and boosted with type II collagen. After the first mice in the cohort of immunized/boosted mice developed a severely inflamed paw, all mice were randomized to receive therapy. Isotype or 1D10 were delivered SC weekly for 5 weeks. Mice were bleed prior to the 2nd, 3rd, 4th, and 5th dose and then at sacrifice. Un-manipulated mice were bled to determine the normal range of serum OPG in the absence of disease. The results are shown in Figure 5.

Non-diseased mice have detectable serum OPG levels (grey circles on left of graphs), but arthritic mice had elevated levels (no dosing graph). Antibody 1D10 exposure decreased the elevated serum OPG levels in the mice primed to get CIA, whereas the isotype control did not. Thus, the bone preserving properties of IL-17A antagonism correlated with this serum marker of bone destruction and OPG is likely to be useful as a biomarker of the effect of anti-IL-17A therapy on joint destruction in human RA patients.

EXAMPLE 8

Modulation of Serum RANKL Levels in CIA Mice by Short Term Anti-IL-17A Therapy

The short term effect of anti-IL-17A antibody 1D10 on serum RANKL and OPG in severely arthritic mice was also assessed.

B10.RIII mice were immunized and boosted with type II collagen. Each mouse was examined and treated intravenously with a single 7 mg/kg dose of isotype or JL7.1D10 when it exhibited a severely inflamed paw ($DSS \geq 2$). Mice were sacrificed seven days after antibody treatment. Un-manipulated mice were bled to determine the normal range of serum RANKL and OPG in the absence of disease. Serum JL7.1D10 concentrations were quantified over the course of the experiment to confirm drug exposure throughout the experiment (data not shown). Statistical analysis was performed using a paired t test and a p value of 0.05 used to delineate significant differences between groups. The results are shown in Figure 6.

Serum RANKL and OPG concentrations were already elevated in severely arthritic mice (mice with $DSS \geq 2$) at the time of antibody treatment. At day 7 post treatment, the elevation in serum RANKL levels observed in the isotype control group ($p < 0.01$) was minimized by the 1D10 treatment (left panel). The same 1D10 exposure had no immediate impact on the elevated serum OPG (right panel), suggesting that the compensatory OPG decrease takes greater than 7 days of 1D10 exposure to trigger. These results further support

the expectation that both RANKL and OPG could be surrogate biomarkers for efficacy of anti-IL-17A therapy in inhibiting joint destruction in inflammatory joint disease.

When the same experiment was performed using a subcutaneous (SC) route of delivery; significantly further elevated serum RANKL was observed with and without IL-17A neutralization. The discrepancy between the results of these experiments may be due to one or more of the following reasons: route of dosing, antibody batch, or variation in disease severity post-boost.

EXAMPLE 9

Anti-IL-17A Inhibition of Joint Destruction in Inflammatory Nonresponders

The above examples demonstrate that IL-17A antagonism with antibody 1D10 decreased bone erosion even in a severely inflamed paw by histopathology and that elevated RANKL and OPG were normalized by 1D10 exposure. Paws from control antibody and 1D10 treated animals were submitted for micro-CT analysis as an additional method to evaluate 1D10's effect on bone metabolism.

B10.RIII mice were immunized and boosted with type II collagen. After the first mice in the cohort of immunized/boosted mice developed a severely inflamed paw, all mice were randomized to receive therapy. The few severely inflamed paws from JL7.1D10 treated mice were compared with the more numerous severely inflamed paws from control antibody treated mice by micro-CT X-ray analysis and the results are shown in Figure 7.

An un-inflamed paw has no evidence of bone erosion at the articular surface; however, a severely inflamed paw from a control treated mouse has extensive bone erosion at the articular surface where the immunogen type II collagen is present. This is evidenced by the replacement of very defined X-ray-dense bone structures at the ends of bones with amorphous X-ray-dense areas around the articular joints. The few severely inflamed joints from 1D10 treated mice have evidence of bone erosion, but the degree of bone erosion is much less than "equally inflamed" paws from control treated mice.

These micro-CT X-Ray results support the rationale that IL-17A antagonism in RA patients will result in reduced bone erosion in the joints versus placebo, even in patients that continue to have active disease as assessed by tender joint count and swollen joint counts. Or stated a different way, IL-17A antagonism can un-couple the outward signs of inflammation from the joint destructive process.

EXAMPLE 10

Effect of Anti-IL-17A Therapy on Serum TRACP Levels in CIA Mice

The effect of long-term anti-IL-17A therapy on serum TRACP levels was also assessed.

5 B10.RIII mice were immunized and boosted with type II collagen. After the first mice in the cohort of immunized/boosted mice developed a severely inflamed paw, all mice were randomized to receive therapy. Isotype rat IgG1 or JL7.1D10 were dosed s.c. weekly for 5 weeks. Mice were bled at sacrifice. Un-manipulated naïve mice were bled to determine the normal range of serum TRACP in the absence of disease. Serum TRACP levels in CIA mice and un-manipulated mice were measured using a commercial mouse TRACP assay (IDS, Fountain Hills, AZ).

Serum TRACP levels were elevated in arthritic mice treated with the isotype rIgG1 control compared to non-diseased (un-manipulated) mice (Figure 8), and these elevated TRACP levels correlated with the level of bone destruction in the swollen paws of the arthritic mice (data not shown). A slight trend to lower serum TRACP levels was observed in arthritic mice treated with 1D10, but this result was not statistically significant (Figure 8). The inventors believe that the failure to see a statistically significant reduction in TRACP levels in this experiment may be due to the terminal sacrifice bleed time point at which TRACP levels were measured for the reasons discussed below.

EXAMPLE 11

Effect of Anti-IL-17A Therapy on Serum CTX-1 and CTX-2 Levels in CIA Mice

25 B10.RIII mice were immunized and boosted with type II collagen. After the first mouse in the cohort of immunized/boosted mice developed a severely inflamed paw, all mice were randomized to receive therapy. Isotype or JL7.1D10 (28, 7 or 2 mg/kg) were delivered s.c. weekly for five weeks. Mice were bled at day 35 post treatment at sacrifice. Un-manipulated B10.RIII mice were bled to determine the normal range of CTX-1 in the absence of arthritis. Serum CTX-I levels were measured using the RatLapsTM CTX-I ELISA (IDS, Fountain Hills, AZ), which recognizes mouse CTX-I. CTX-II levels were measured using the serum pre-clinical CartiLaps® CTX-II ELISA (IDS, Fountain Hills, AZ). The results (not shown) indicate that (1) CTX-I was present in un-manipulated mouse serum, but was not elevated in arthritic mice serum, and (2) CTX-II was below the limit of detection in non-

arthritic (normal) and arthritic mouse serum. JL7.1D10 did not detectably alter the basal levels for CTX-I or CTX-II.

EXAMPLE 12

5 Effect of Anti-IL-17A Therapy on Serum Osteocalcin Levels in CIA Mice

B10.RIII mice were immunized and boosted with type II collagen. After the first mouse in the cohort of immunized/boosted mice developed a severely inflamed paw, all mice were randomized to receive therapy. Isotype or 22 mg/kg of JL7.1D10 were delivered s.c. weekly for five weeks. Mice were bled at day 35 post treatment at sacrifice. Un-manipulated mice were bled at 10 weeks, 14 weeks, and 26 weeks of age to determine normal range of osteocalcin throughout arthritis model. Serum osteocalcin levels were measured using a commercial mouse osteocalcin sandwich ELISA assay (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA). The results are shown in Figure 9.

Arthritic mice treated with the isotype control had depressed osteocalcin levels compared to the levels in un-manipulated (normal) mice. While treatment with the JL7.1D10 antibody did not significantly modulate these levels, there was a trend to normalization of the depressed osteocalcin levels by JL7.1D10.

EXAMPLE 13

20 Dynamics of serum RANKL and OPG levels as mice progress through the CIA model

Male B10.RII mice were immunized with CII in CFA and bleed weekly for 3 weeks during the induction period (Untxt). Mice were then boosted with CII in IFA and randomized to various treatment groups at the first sign of severe paw swelling. Some mice were dosed with 7-30 mg/kg control antibodies 25D2 or 27F11 subcutaneously weekly for 5 weeks. The results were pooled from five independent experiments and expressed as means $\pm$ SEM. of arthritic groups (n=10-30). The results are shown in Figure 10.

As seen in the left panel of Figure 10, serum RANKL levels increased starting the second week of the effector phase (disease progression) and remained elevated in the cohort of immunized/boosted mice for four weeks post-boost compared with un-manipulated control mice (horizontal lines). Elevated serum OPG levels, in contrast, appeared in the first week of the induction phase and were returning to baseline by the second week of the effector phase (Fig. 10, right panel). These results indicate that serum RANKL levels were elevated during

the disease progression phase of the model when joint bone erosion occurs within severely swollen arthritic paws. RANKL's natural antagonist, OPG, which had been elevated during the induction phase was back to normal physiologic levels by the time that the pro-osteoclast RANKL was starting to rise in the serum. Serum OPG levels were 5-10 times higher than serum RANKL levels regardless of the time point examined. The increased serum RANKL is most likely complexed with the higher serum OPG levels and neutralized.

EXAMPLE 14

Correlation of elevated RANKL with Paw Swelling in CIA Mice

The data discussed in Example 13 shows that serum RANKL is elevated in the CIA model over a certain time-course and previous data showed that paw swelling occurred over a similar time course. To assess the degree of correlation between serum RANKL levels and paw swelling, mice were immunized, boosted, randomized to treatment at the first sign of severe paw swelling, and then treated with rat IgG1 isotype control antibody subcutaneously weekly for 5 weeks. Each week's serum RANKL concentration versus total animal DSS from individual mice was compiled from four independent experiments and the statistical analysis of the data was performed using non-parametric Kruskal-Wallis analysis.

Figure 11 shows the resulting week by week snapshot association between serum RANKL levels and disease activity in CIA mice treated with the isotope control antibody. Serum RANKL levels were only elevated in those mice that had at least one severely swollen paw (DSS=2-3) at week 2 or that had multiple severely swollen paws (DSS>3) from weeks 3-5. Importantly, mice immunized and boosted that had not initiated any paw swelling response (DSS=0) or that only initiated a mild paw swelling response in only one paw (DSS=1) showed no signs of elevated serum RANKL at any time point. A similar weekly profile between serum RANKL levels and disease activity in CIA mice was observed when mice were treated with a different control antibody (mouse IgG1 antibody 27F11). The data with both control antibodies support a conclusion that serum RANKL levels are elevated in CIA mice at week 2 and beyond once the mice demonstrate at least one severely swollen paw, and conversely was not just a reflection of time post-challenge, i.e. immunized/boosted mice with no signs of paw swelling did not have elevated serum RANKL.

Companion paw histology assessment studies concluded that significant bone erosion only occurred in severely swollen paws (DSS=2-3), not in minimally swollen paws (DSS=1) and not in un-inflamed paws from mice with "other paws" severely inflamed (DSS=0).

52

Therefore, the inventors herein believe that elevated serum RANKL is directly correlated with the on-going bone erosion in the CIA model and that serum RANKL could be used as a PK-PD marker to follow response to experimental or approved therapies that impact osteoclastogenesis, and further that this marker could be assessed prior to or instead of determining therapeutic outcomes with standard joint histopathology techniques.

EXAMPLE 15

Mice with multiple severely swollen paws have elevated serum OPG levels.

To assess the time course of the correlation between serum OPG levels and paw swelling, the experiment described in Example 14 was repeated using either a rat IgG1 isotype control antibody or a mouse IgG1 isotype control antibody and measuring the serum OPG levels instead of RANKL antibodies. The results with the rat IgG1 isotype control are shown in Figure 12.

A proportion of not-yet-arthritic mice (DSS=0) at week 1 had elevated serum OPG levels that were still present due to the OPG elevation from the induction phase of the model. In contrast to the data generated in Example 13, where the average serum OPG levels in the "cohort of immunized and boosted" mice had fallen into the physiologic range from week 2 onward (Fig. 10, right panel), Figure 12 shows a different picture. Serum OPG levels were "re-elevated" in the few mice with multiple severely swollen paws at week 2 over the more numerous other members of the cohort that were not-yet-arthritic. Mice with multiple severely swollen paws at later time points did not show greatly elevated serum OPG.

A similar weekly profile of serum OPG levels and mouse DSS was obtained when mice were dosed with mouse IgG1 isotype control (data not shown). In particular, elevated serum OPG levels were only seen in mice with multiple severely swollen paws with the level at week 2 being statistically significant and trends toward significance seen at weeks 3-4.

The above-described association between severe paw swelling and elevated serum OPG was only observed when the cohort of immunized and boosted mice were analyzed separately based on the disease severity. This was due to OPG's biphasic response in the CIA model wherein it was elevated in the induction phase and drops throughout the effector phase overlaid on a second profile of being re-elevated in mice with multiple severely swollen paws.

EXAMPLE 16

JL7.1D10 reduces arthritis-associated serum RANKL levels

The results discussed in the above examples show (1) that elevated serum RANKL and OPG were seen in mice that had progressed to having at least one severely swollen paw and (2) that IL-17A neutralization inhibited bone erosion, even in the few severely swollen paws that were observed.

5 To assess whether anti-IL-17A neutralization modulates the severe arthritis-associated elevation in RANKL levels, mice were immunized, challenged, randomized to treatment at the first sign of severe paw swelling, and then treated subcutaneously weekly for 5 weeks with 7 mg/kg of rat IgG1 isotype control (25D2) mAb, or 2, 7, or 28 mg/kg of JL7.1D10 mAb. Serum drug concentrations were quantified over the course of the experiment to confirm drug
10 exposure throughout the experiment. The serum RANKL levels were plotted over time from individual mice and the results are shown in Figure 13.

Serum RANKL levels were elevated in untreated and isotype control mice (Figure 13, upper left and right) over the time course of the CIA model, as also shown in Figure 10 (left panel). Dosing with ≥ 7 mg/kg JL7.1D10 weekly for five weeks attenuated the
15 arthritis-associated elevated serum RANKL levels (Figure 13, lower middle panel). These results indicate that endogenous IL-17A plays a major role in RANKL production in CIA mice and that JL7.1D10 inhibition of RANKL expression may be partially the explanation for why JL7.1D10 inhibited joint bone erosion, even in the few paws that became severely swollen.

20 Further analysis of the data presented in Figures 11 and 13 showed that there were many fewer severely arthritis mice and many more non-arthritic mice in the JL7.1D10 treated group, and that serum RANKL levels were diminished even in the few JL7.1D10-treated mice that did progress to having multiple severely swollen paws compared to clinically equal control treated mice (data not shown). This result was statistically significant at week 4 and
25 non-significant trends were observed at week 2, 3, and 5.

EXAMPLE 17

JL7.1D10 normalizes serum OPG levels early in the disease progression stage

30 As discussed above, regulation of serum OPG levels is very complex in the mouse CIA model as evidenced by a biphasic component of OPG expression (i.e. elevation in the induction phase and a slow decrease into the disease progression phase) that is superimposed on a multiple-severely-swollen-paw-associated increase in serum OPG in the disease progression phase. To assess whether IL-17A neutralization within this complex regulation

demonstrated any convincing modulation, mice were immunized, challenged, randomized to treatment at the first sign of severe paw swelling, and then treated subcutaneously weekly for 5 weeks with 7 mg/kg rat IgG1 isotype control (25D2) mAb or 28 mg/kg JL7.1D10 mAb. Serum drug concentrations were quantified over the course of the experiment to confirm drug exposure throughout the experiment. The weekly serum OPG profiles from individual mice are presented in Figure 14.

Serum OPG concentrations were still elevated in both untreated and isotype control mice at the first time point studied in the disease progression phase and the average OPG level in the cohort of mice decreased over time, but with a very heterogeneous profile within the cohort. Weekly injections of 28 mg/kg JL7.1D10 for five weeks strikingly reduced serum OPG levels to near uniform levels within the physiologic range by the second week post-boost (Figure 14, right panel).

To assess how IL-17A neutralization affected "re-elevated" OPG levels in the few "multiple-severely-swollen-paw" mice that broke through anti-IL-17A therapy, further analysis of the data presented in Figures 12 and 14 was conducted to measure the effect of IL-17A neutralization on the correlation between serum OPG concentrations versus "multiple-severely-swollen-paw" mice. JL7.1D10 reduced serum OPG levels in mice with multiple severely swollen paws (DSS>3) statistically at week 5 and with trends at earlier time points (data not shown).

EXAMPLE 18

Effect of IL-17A on serum RANKL and OPG levels in non-diseased mice

The data discussed above indicate that IL-17A plays a significant role in RANKL and OPG production in arthritic mice and that IL-17A neutralization inhibits arthritis-associated bone erosion in mice presumably by inhibiting osteoclast differentiation/activity. To assess whether endogenous IL-17A had a significant role in normal bone homeostasis, serum RANKL or OPG levels were measured in normal B10.RIII mice before and during five weekly treatments of 28 mg/kg JL7.1D10 subcutaneously. The 1D10 treatment did not alter the physiologic serum RANKL or OPG levels in these normal mice, a result consistent with a conclusion that endogenous IL-17A is not critical for physiologic, non-inflammatory RANKL- and OPG-mediated bone biology in normal mice.



EXAMPLE 19

Anti-IL-17A treatment is efficacious in rat adjuvant-induced arthritis

The rat adjuvant-induced arthritis (AIA) is another example of a severe bone erosive model. The model is initiated by a single injection of Complete Freund's Adjuvant (CFA) at the tail base, symmetric joint swelling responses start at day 10 to day 13, and severe bone erosion is seen by day 21.

To investigate the role of IL-17A in the AIA model, an antibody that binds and neutralizes rat IL-17A was identified (JL8.18E10). Starting prior to CFA injection, dark Agouti rats were treated with weekly doses of an isotype antibody or 0.8, 4 or 20 mg/kg of JL8.18E10. The data, which are shown in Figure 15, indicate that each dose of JL8.18E10 totally prevented arthritis onset. Similar experiments using the rat AIA model established that JL8.18E10 inhibited joint swelling whether administered at day 10 (disease onset) or day 12 (established disease) and also could inhibit the severe weight loss that is a property of AIA rats (data not shown).

To investigate whether IL-17A neutralization affects RANKL levels in the rat AIA model, RANKL was measured in serum harvested at sacrifice from rats dosed preventatively or at disease onset with JL8.18E10 or an isotype control. JL8.18E10 decreased serum RANKL in both treatment modes compared to isotype treated rats (data not shown).

EXAMPLE 20

Anti-IL-17A treatment reduces arthritis-associated elevated serum RANKL in rat adjuvant-induced arthritis

To assess the effect of IL-17A neutralization on RANKL in the AIA model, rats with established disease were treated with 20 mg/kg of an isotype control, a single 4 mg/kg or 20 mg/kg dose of JL8.18E10, or a 25 mg/kg dose of a TNF antagonist (etanercept) given every 3 days. The rats were bled at day 8 (prior to joint swelling), day 14 (three days after antibody treatment), and at the day 25 sacrifice. Serum RANKL was measured at each time point and the results are shown in Figure 16.

Only three days of JL8.18E10 treatment was needed to inhibit the arthritis-associated elevated serum RANKL, while three days of TNF antagonism was not as effective in modulating serum RANKL. It should be noted that, at Day 14, the JL8.18E10 rats were still arthritic but their serum RANKL levels had been normalized.



Citation of the above publications or documents is not intended as an admission that any of the foregoing is pertinent prior art, nor does it constitute any admission as to the contents or date of these publications or documents. All references (publications, accession numbers, patent applications and patents) cited above are expressly incorporated by reference

5 to the same extent as if each individual publication, accession number, patent application, or patent, was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

52

CLAIMS

WHAT IS CLAIMED IS:

- 5 1. A method of selecting a patient with an inflammatory joint disease for treatment with an IL-17A antagonist, comprising
- 10 a. comparing the level of at least one joint destruction biomarker in a serum sample taken from the subject with the normal range of serum levels for the biomarker; and
- b. selecting the patient for treatment with the IL-17A antagonist if the level of the joint destruction biomarker in the subject's serum sample is outside of the normal range.
- 15 2. The method of claim 1, wherein the joint destruction biomarker is selected from the group consisting of cartilage oligomer matrix protein (COMP), C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (CTX-I), C-terminal cross-linking telopeptide of type II collagen (CTX-II), human cartilage glycoprotein-39 (HC gp-39), osteoprotegrin (OPG), Receptor activator of NFκB ligand (RANKL), osteocalcin and Tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) isoform 5b.
- 20 3. The method of claim 1, wherein the patient is an inflammatory non-responder to previous treatment with a different anti-rheumatic drug.
- 25 4. The method of claim 1, wherein the patient is an inflammatory responder to previous treatment with a different anti-rheumatic drug.
5. The method of claim 1, wherein the joint destruction biomarker is RANKL, COMP or OPG.
- 30 6. The method of claim 5, wherein the joint destruction biomarker is RANKL.
7. The method of claim 1, wherein the comparing step is performed on each of RANKL, COMP and OPG.

8. The method of claim 1, wherein the IL-17A antagonist is a monoclonal antibody or monoclonal antibody fragment that binds to and inhibits the activity of human IL-17A.

5 9. The method of claim 8, wherein the IL-17A antagonist is a humanized monoclonal antibody or a fully human monoclonal antibody.

10. The method of claim 8, wherein the IL-17A antagonist is a humanized monoclonal antibody fragment or a fully human monoclonal antibody fragment.

10

11. The method of claim 8, wherein the monoclonal antibody or monoclonal antibody fragment is pegylated.

12. The method of claim 1, wherein the inflammatory joint disease is rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis or ankylosing spondylitis.

15

13. The method of claim 12, wherein the inflammatory joint disease is rheumatoid arthritis.

20

14. The method of claim 14, wherein the IL-17A antagonist is a humanized monoclonal antibody which comprises a light chain having SEQ ID NO:1 and a heavy chain having SEQ ID NO:2.

25

15. A method of predicting efficacy of an IL-17A antagonist in inhibiting bone erosion in a subject with an inflammatory joint disease, comprising:

30

- a. determining the level of at least one joint destruction biomarker in a first serum sample taken from the subject prior to an initial treatment period with the IL-17A antagonist;
- b. determining the level of the joint destruction biomarker in at least a second serum sample taken from the patient at the end of the initial treatment period; and
- c. comparing the levels of the joint destruction biomarker in the first and second serum samples;



wherein a normalization of the level of the joint destruction biomarker in the second serum sample compared to the level in the first serum sample predicts that the IL-17A antagonist will likely be effective in inhibiting joint destruction in the subject, and wherein the subject is a human or a non-human animal.

5

16. The method of claim 15, wherein the joint destruction biomarker is selected from the group consisting of cartilage oligomer matrix protein (COMP), C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (CTX-I), C-terminal cross-linking telopeptide of type II collagen (CTX-II), human cartilage glycoprotein-39 (HC gp-39), osteoprotegrin (OPG), Receptor activator of NF κ B ligand (RANKL), osteocalcin and Tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) isoform 5b.

10

17. The method of claim 15, wherein the initial treatment period is at least one week, at least two weeks, at least four weeks, at least eight weeks, at least twelve weeks, at least eighteen weeks, at least twenty-four weeks or at least forty-eight weeks.

15

18. The method of claim 15, further comprising comparing the level of the biomarker in the first and second serum samples with the normal range of serum levels of the biomarker, wherein the IL-17A antagonist is predicted to be effective in inhibiting joint destruction in the subject if the level of the joint destruction biomarker in the first serum sample is outside of the normal range and the level of the biomarker in the second serum sample falls within the normal range.

20

19. The method of claim 15, further comprising determining the level of the joint destruction biomarker in a third serum sample taken from the subject at the end of at least one subsequent treatment period with the IL-17A antagonist, wherein a level of the biomarker in the third serum sample that is more normalized than the level of the biomarker in the second serum sample predicts that the IL-17A antagonist will likely be effective in inhibiting joint destruction in the subject.

25

30

20. The method of claim 19, wherein the subsequent treatment period is at least 12 weeks, at least 24 weeks or at least 48 weeks.

21. The method of claim 15, wherein the biomarker is RANKL, COMP or OPG.

22. The method of claim 15, wherein the biomarker is RANKL.

23. The method of claim 15, wherein the determining and comparing steps are performed
5 on each of RANKL and COMP or on each of RANKL, COMP and OPG.

24. The method of claim 15, wherein the IL-17A antagonist is a monoclonal antibody or
monoclonal antibody fragment that binds to and inhibits the activity of IL-17A.

10 25. The method of claim 24, wherein the subject is a human and the IL-17A antagonist is a
humanized monoclonal antibody or a fully human monoclonal antibody.

26. The method of claim 24 wherein the subject is a human and the IL-17A antagonist is a
humanized monoclonal antibody fragment or a fully human monoclonal antibody fragment..

15

27. The method of claim 24, wherein the monoclonal antibody or monoclonal antibody
fragment is pegylated.

20

28. The method of claim 24, wherein the IL-17A antagonist is a humanized monoclonal
antibody or a fully human monoclonal antibody and during the subject is treated during the
initial treatment period with a dose of the antibody that has been shown to be effective in
inhibiting joint destruction in a population of subjects with the inflammatory joint disease.

25

29. The method of claim 15, wherein the inflammatory joint disease is rheumatoid
arthritis, psoriatic arthritis or ankylosing spondylitis.

30. The method of claim 29, wherein the inflammatory joint disease is rheumatoid
arthritis.

30

31. The method of claim 30, wherein the IL-17A antagonist is a humanized monoclonal
antibody which comprises a light chain having SEQ ID NO:1 and a heavy chain having SEQ
ID NO:2.

32. The method of claim 15, wherein the subject is an inflammatory non-responder to previous treatment with a different anti-rheumatic drug.

33. The method of claim 15, wherein the subject is an inflammatory responder to previous treatment with a different anti-rheumatic drug.

34. A method of treating a subject for an inflammatory joint disease with an IL-17A antagonist, comprising

- a. determining the level of at least one joint destruction biomarker in a first serum sample taken from the subject;
- b. administering the IL-17A antagonist to the subject according to a first dosing regimen during an initial treatment period;
- c. determining the level of the joint destruction biomarker in at least a second serum sample taken from the patient at the end of the initial treatment period; and
- d. comparing the levels of the biomarker in the first and second serum samples; and
- e. administering the IL-17A antagonist to the subject according to the first dosing regimen during at least one subsequent treatment period if the level of the biomarker in the second serum sample is within a specified range; or
- f. administering the IL-17A antagonist to the subject according to a second dosing regimen during at least one subsequent treatment period if the level of the biomarker in the second serum sample is outside of the specified range, wherein the second dosing regimen comprises administering a total amount of the IL-17A antagonist during the subsequent treatment period that is higher than the total amount administered during the initial treatment period,

wherein the specified range is selected from the group consisting of:

- (i) the range of serum levels of the joint destruction biomarker found in untreated subjects who do not have the inflammatory joint disease; and
- (ii) the range defined by a confidence interval of at least 80% of the mean level of the joint destruction biomarker measured in a population of subjects with the inflammatory joint disease who were treated with the IL-17A antagonist according to the first dosing regimen for a time period equal to or longer than

the initial treatment period, wherein the population exhibited inhibition of joint destruction following treatment with the IL-17A antagonist according to the first dosing regimen during a time period equal to or longer than the subsequent treatment period.

5

35. The method of claim 34, wherein the joint destruction biomarker is selected from the group consisting of cartilage oligomer matrix protein (COMP), C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (CTX-I), C-terminal cross-linking telopeptide of type II collagen (CTX-II), human cartilage glycoprotein-39 (HC gp-39), osteoprotegerin (OPG), Receptor activator of NF κ B ligand (RANKL), osteocalcin and Tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) isoform 5b.

10

36. The method of claim 34, wherein the specified range is defined by a confidence interval of at least 85%, at least 90% or at least 95% of the mean level of the joint destruction biomarker measured in a population of subjects with the inflammatory disease who were treated with the IL-17A antagonist according to the first dosing regimen for an initial time period of at least 4 weeks, wherein the population exhibited inhibition of joint destruction following treatment with the IL-17A antagonist according to the first dosing regimen during a subsequent treatment period of at least 12 weeks.

15

20

37. The method of claim 34, wherein the initial treatment period is at least one week, at least two weeks, at least four weeks, at least eight weeks or at least twelve weeks.

38. The method of claim 34, wherein the subsequent treatment period is at least 12 weeks, at least 24 weeks or at least 48 weeks.

25

39. The method of claim 34, wherein the joint destruction biomarker is RANKL.

40. The method of claim 34, wherein the inflammatory joint disease is rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis or ankylosing spondylitis.

30



41. The method of claim 34, wherein the subject is a human, the inflammatory joint disease is rheumatoid arthritis and the IL-17A antagonist is a humanized monoclonal antibody which comprises a light chain having SEQ ID NO:1 and a heavy chain having SEQ ID NO:2.

5 42. The method of claim 34, wherein the subject is an inflammatory non-responder to previous treatment with a different anti-rheumatic drug.

43. The method of claim 34, wherein the subject is an inflammatory responder to previous treatment with a different anti-rheumatic drug.

10 44. The method of claim 34, wherein the IL-17 antagonist is an antibody that does not bind to IL-23 and the method further comprises administering an IL-23 antagonist to the patient during the initial treatment period, during the subsequent treatment period, or during both the initial and subsequent treatment periods.

15 45. A kit for treating an inflammatory joint disease, wherein the kit comprises a pharmaceutical composition and reagents for measuring the level of at least one joint destruction biomarker in a serum sample taken from a subject, wherein the pharmaceutical composition comprises an IL-17A antagonist and the joint destruction biomarker is selected from the group consisting of cartilage oligomer matrix protein (COMP), C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (CTX-I), C-terminal cross-linking telopeptide of type II collagen (CTX-II), human cartilage glycoprotein-39 (HC gp-39), osteoprotegerin (OPG), Receptor activator of NFκB ligand (RANKL), osteocalcin and Tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) isoform 5b.

20 46. The kit of claim 45, wherein the inflammatory joint disease is rheumatoid arthritis, the IL-17A antagonist is a humanized monoclonal antibody which comprises a light chain having SEQ ID NO:1 and a heavy chain having SEQ ID NO:2, and the joint destruction biomarker is RANKL.

25 30 47. A manufactured drug product for treating an inflammatory joint disease, which comprises a pharmaceutical formulation comprising an IL-17A antagonist and instructions for

determining patient serum levels of at least one joint destruction biomarker before and during treatment with the IL-17A antagonist.

48. The manufactured drug product of claim 47, wherein the joint destruction biomarker is selected from the group consisting of cartilage oligomer matrix protein (COMP), C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (CTX-I), C-terminal cross-linking telopeptide of type II collagen (CTX-II), human cartilage glycoprotein-39 (HC gp-39), osteoprotegrin (OPG), Receptor activator of NF κ B ligand (RANKL), osteocalcin and Tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) isoform 5b.

49. The manufactured drug product of claim 47, wherein the instructions further comprise recommending use of the pharmaceutical formulation for treating patients who have an abnormal level of the biomarker following previous therapy with a different anti-rheumatic drug.

50. The manufactured drug product of claim 47, wherein the instructions further comprise recommending use of the pharmaceutical formulation for treating patients who are inflammatory non-responders following previous therapy with a different anti-rheumatic drug.

51. The manufactured drug product of claim 43, wherein the inflammatory joint disease is rheumatoid arthritis, the IL-17A antagonist is a humanized monoclonal antibody which comprises a light chain having SEQ ID NO:1 and a heavy chain having SEQ ID NO:2, and the joint destruction biomarker is RANKL, COMP or OPG.

(52) The use of an IL-17A antagonist for preparing a medicament for treating a patient having an inflammatory joint disease to inhibit joint destruction, wherein the patient has an abnormal level of at least one joint destruction biomarker after previous treatment with a different anti-rheumatic therapy.

(53) The use according to claim 52, wherein the joint destruction biomarker is selected from the group consisting of cartilage oligomer matrix protein (COMP), C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (CTX-I), C-terminal cross-linking telopeptide of type II collagen (CTX-II), human cartilage glycoprotein-39 (HC gp-39), osteoprotegrin (OPG),



Receptor activator of NF κ B ligand (RANKL), osteocalcin and Tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) isoform 5b.

- 5 (54) The use of claim 52, wherein the patient is an inflammatory non-responder to the different anti-rheumatic therapy.
- (55) The use of claim 52, wherein the patient is an inflammatory responder to the different anti-rheumatic therapy.
- 10 (56) The use of claim 52, wherein the IL-17A antagonist is a humanized monoclonal antibody which comprises a light chain having SEQ ID NO:1 and a heavy chain having SEQ ID NO:2, and the joint destruction biomarker is RANKL, COMP or OPG.



1/22

-----CDRL1-----

H₂N-DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC KSSQSLLFSENQKNYLA
WYLQKPGQSPQLLIY

-CDRL2-

--CDRL3--

WTSTRQS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC QQSYYTPYT

FGQGTKVEIKR

human kappa constant light domain

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQ

DSKDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-cooh

Figure 1A

62

2/22

---CDRH1--

H₂N-QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVS GFSLPSHSVS WIRQPPGKGLEWIG

-----CDRH2-----

IIWNQGGTDYNSAFKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR

-----CDRH3-----

NAYITDYYYENYFMDA WGQGTLLVTVSS

human IgG1 Fc (CH1-hinge-CH2-CH3)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCLVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK-COOH

Figure 1B

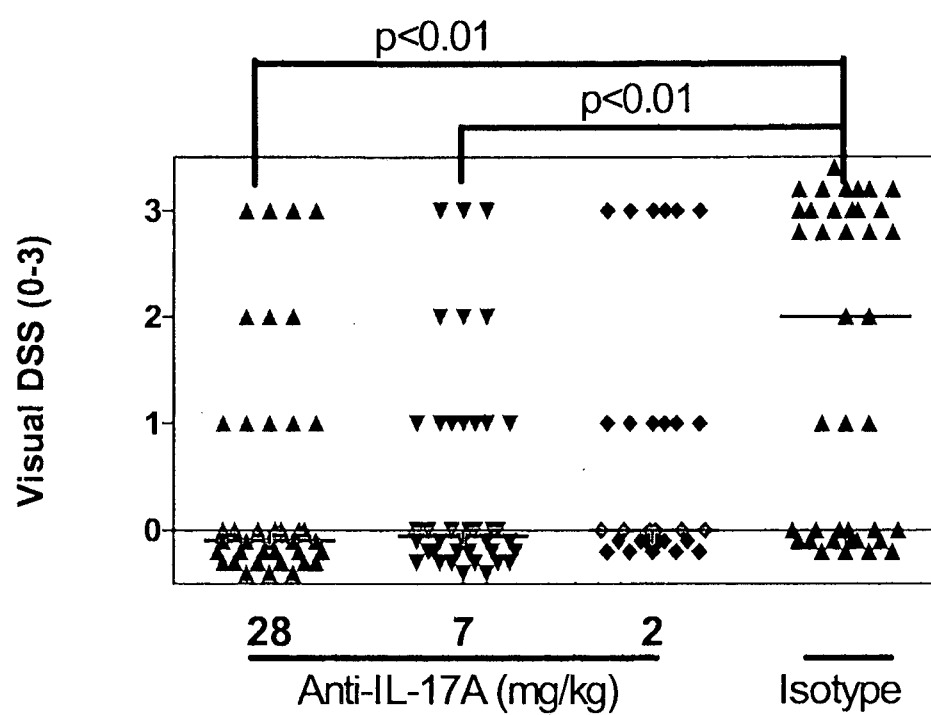


Figure 2A

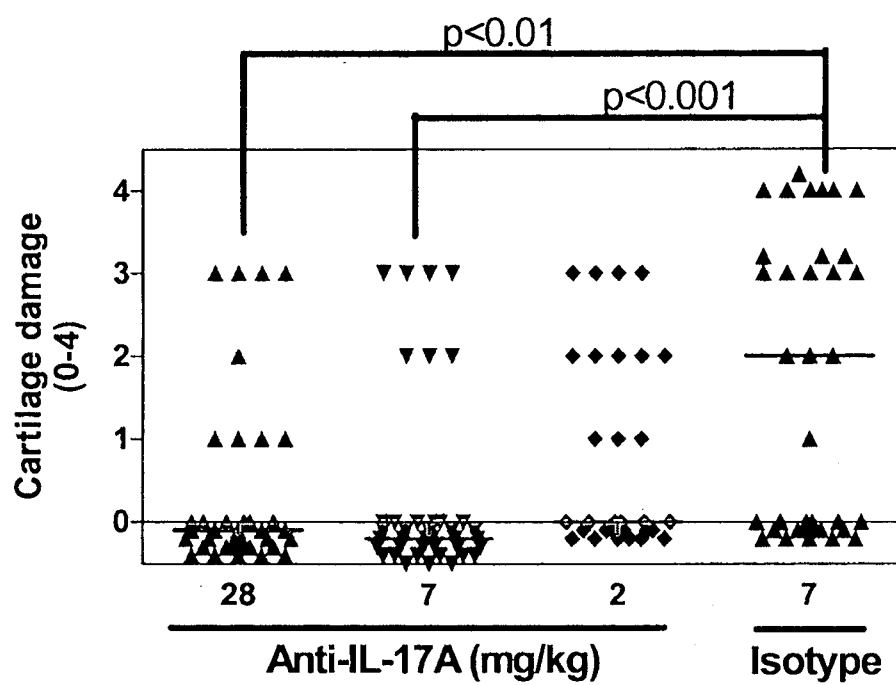
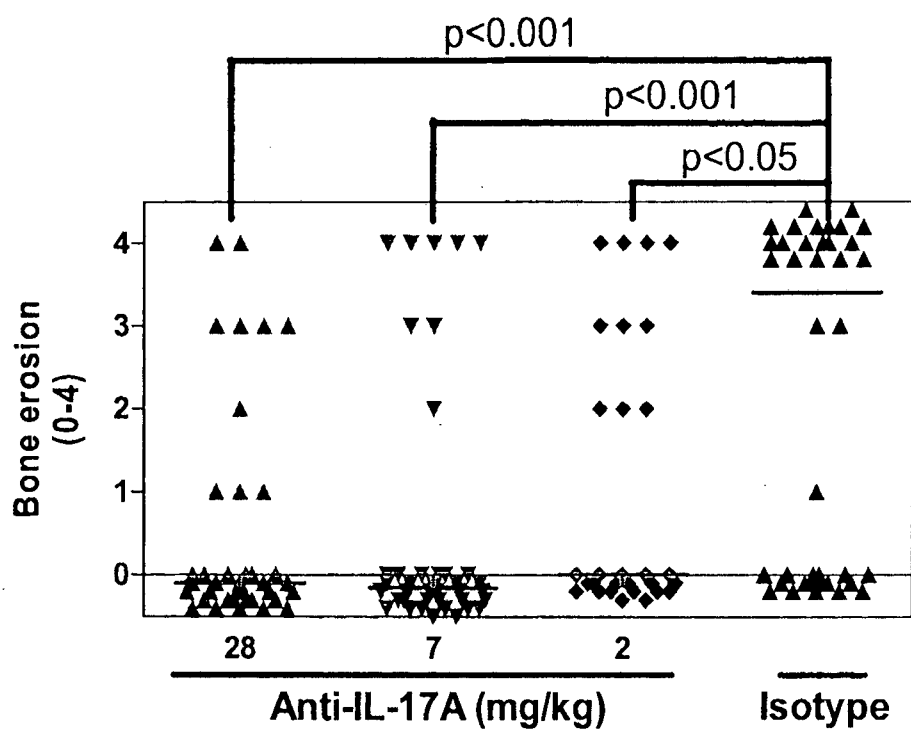


Figure 2B

5 / 22



6/22

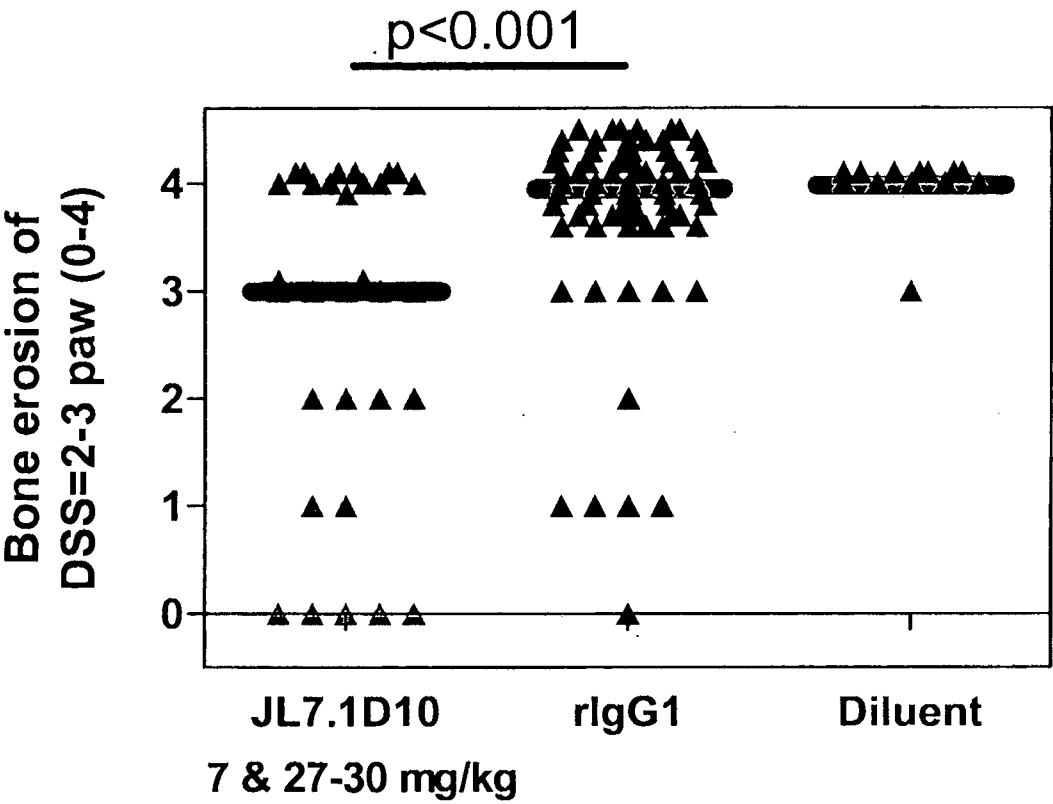


Figure 2D

2

7/22

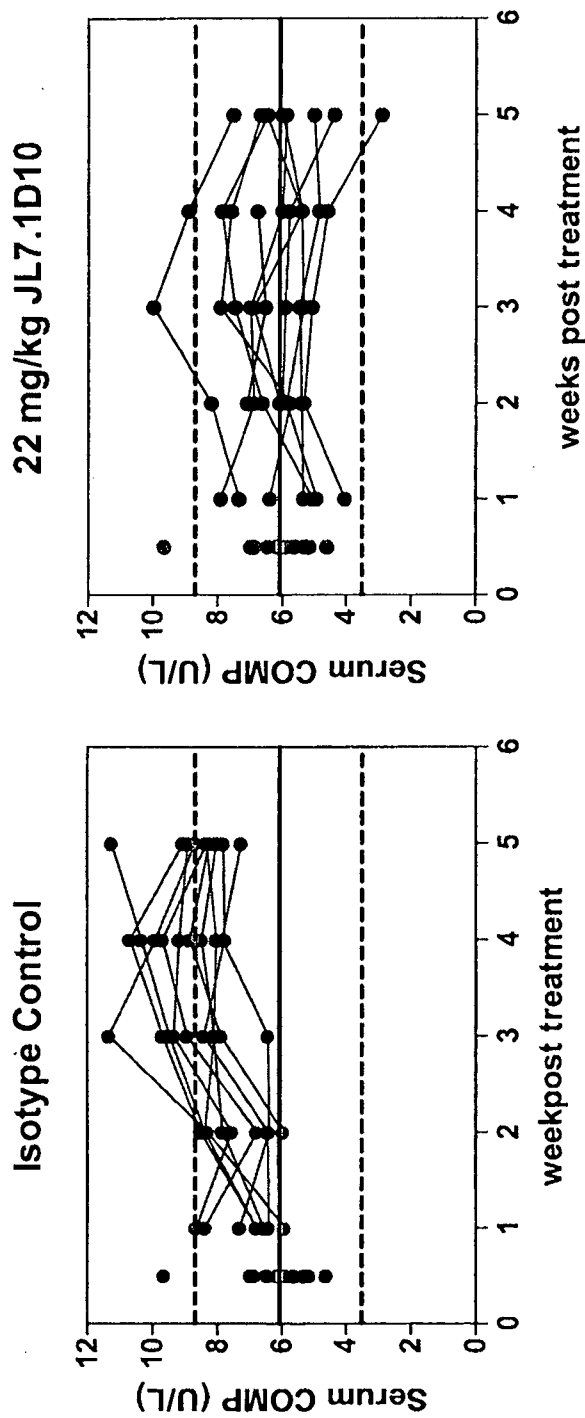


Figure 3A

23

8/22

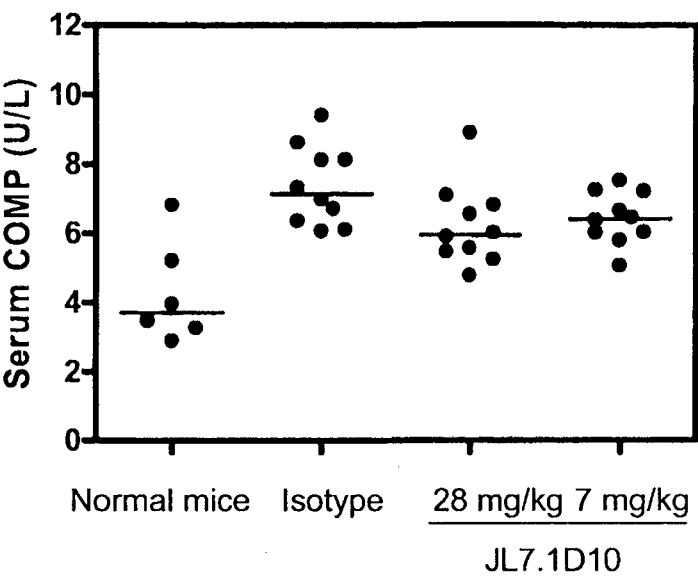


Figure 3AA

9 / 22

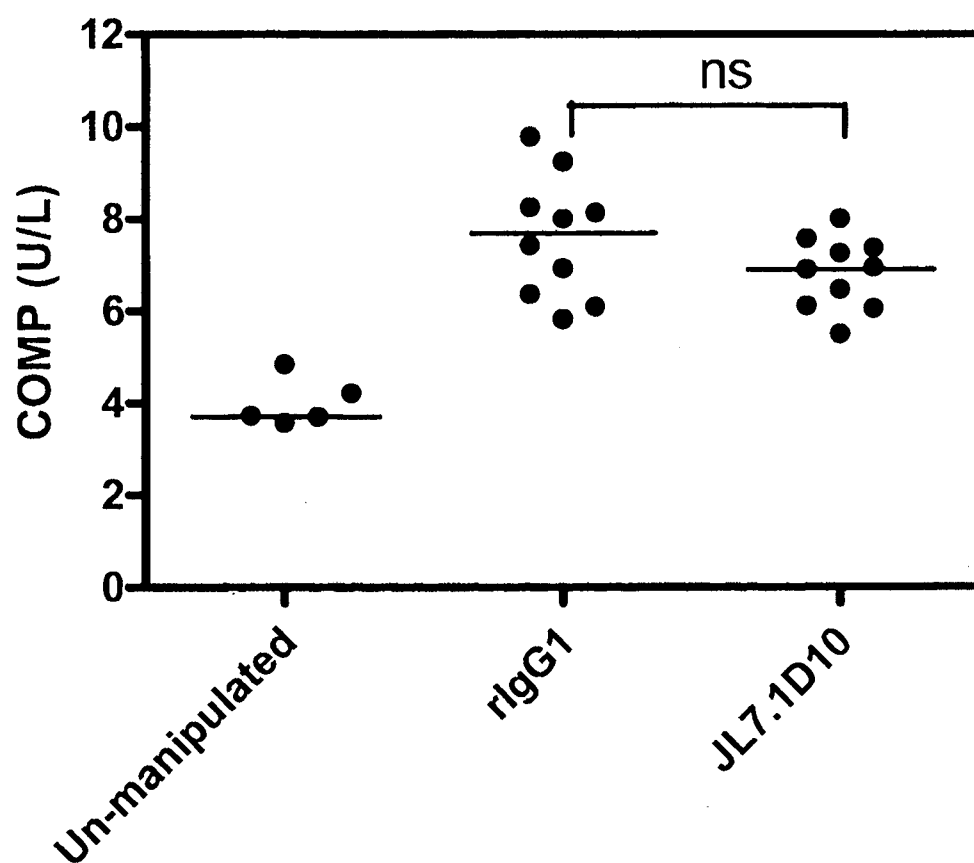


Figure 3B

25

10/22

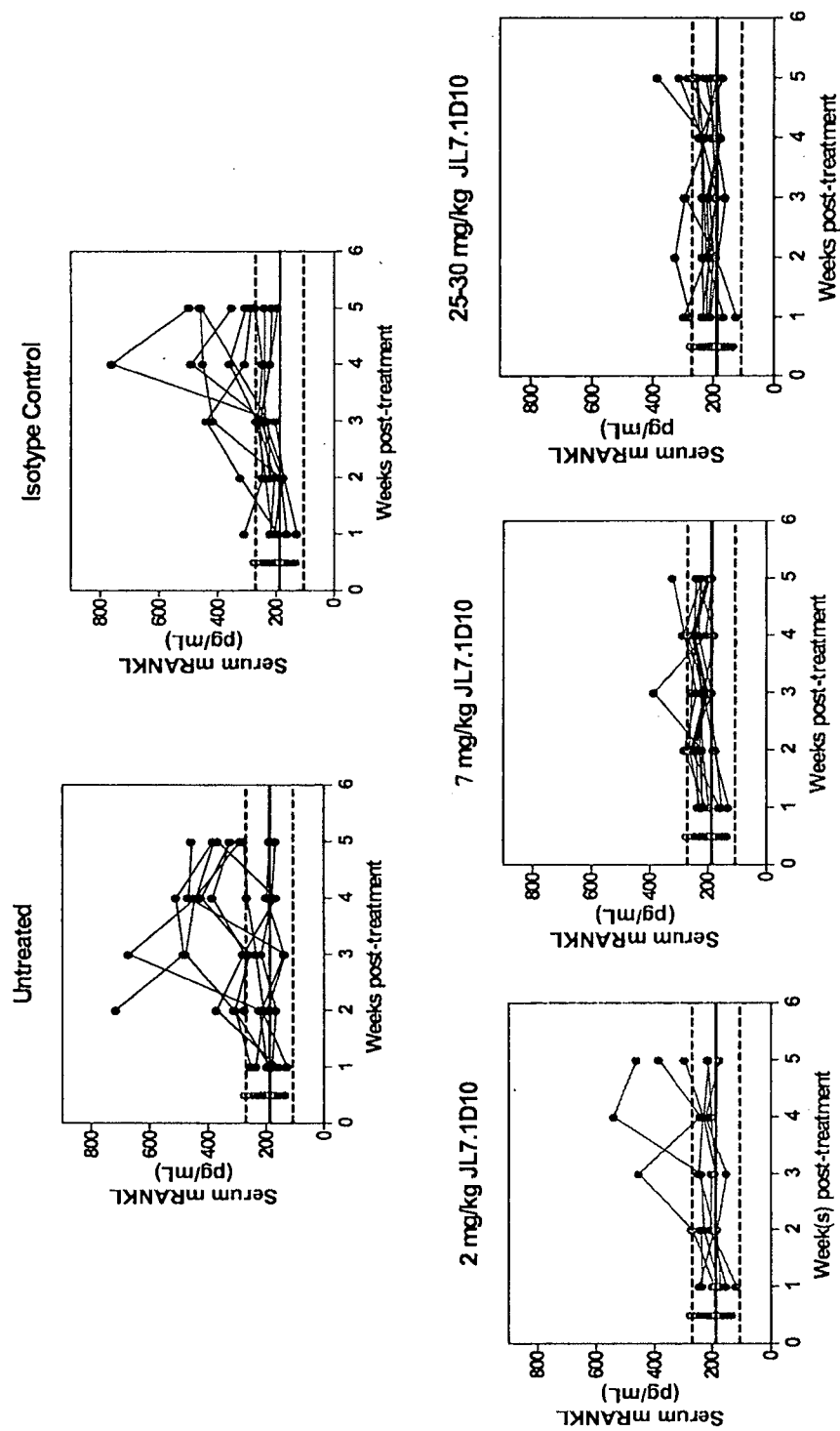


Figure 4

26

11/22

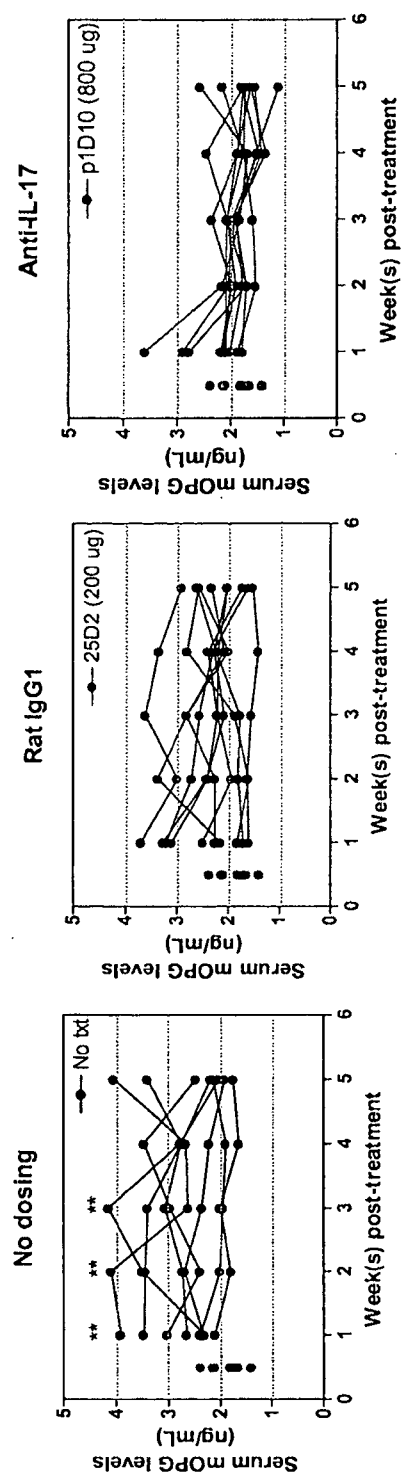


Figure 5

Handwritten signature

12/22

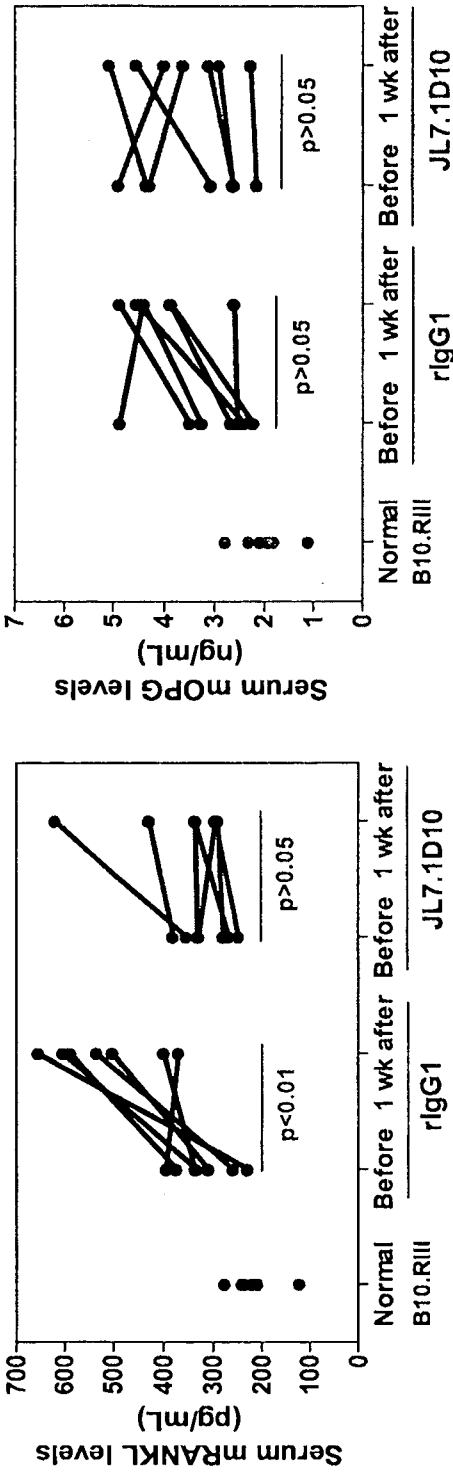


Figure 6



13/22

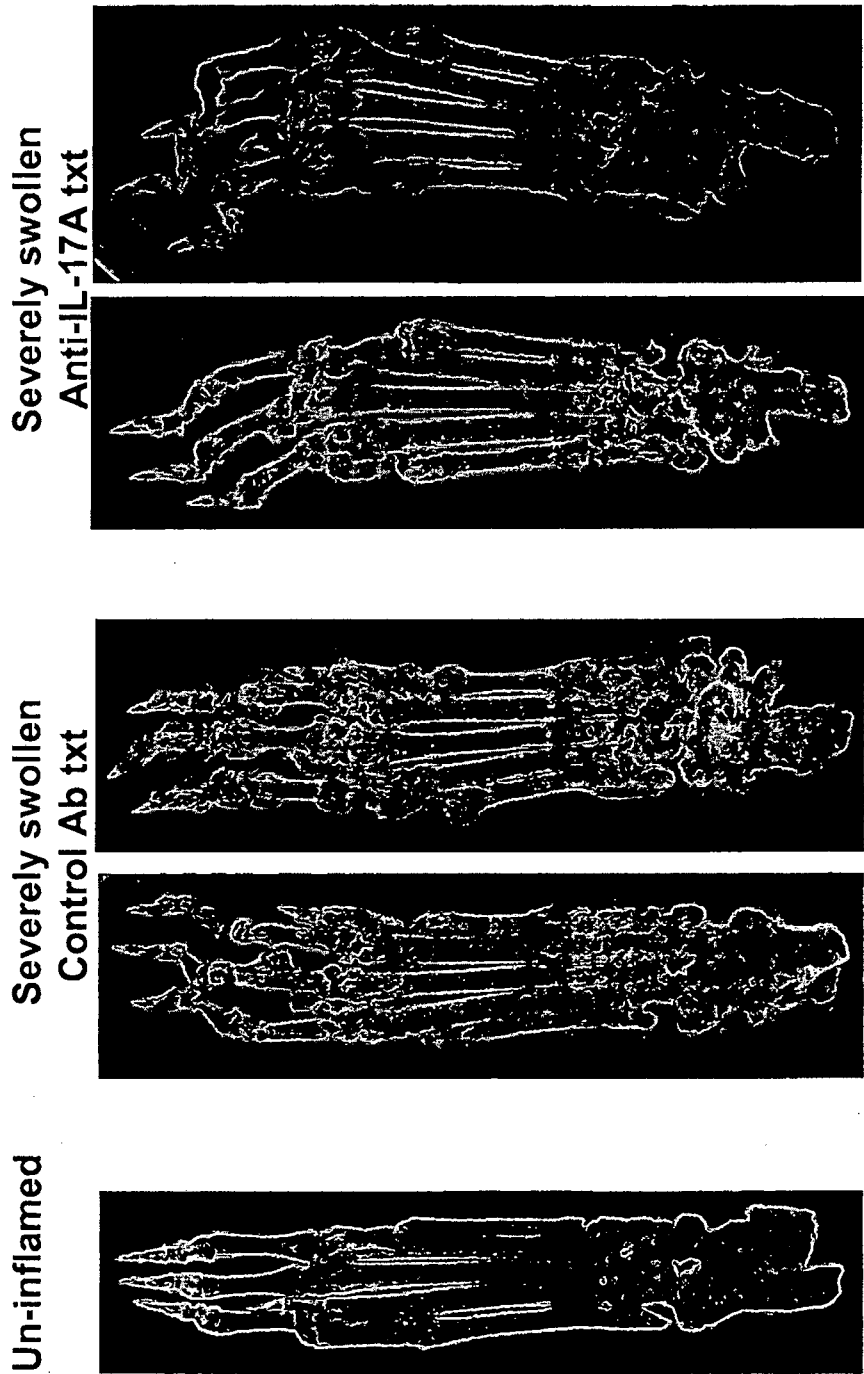


Figure 7

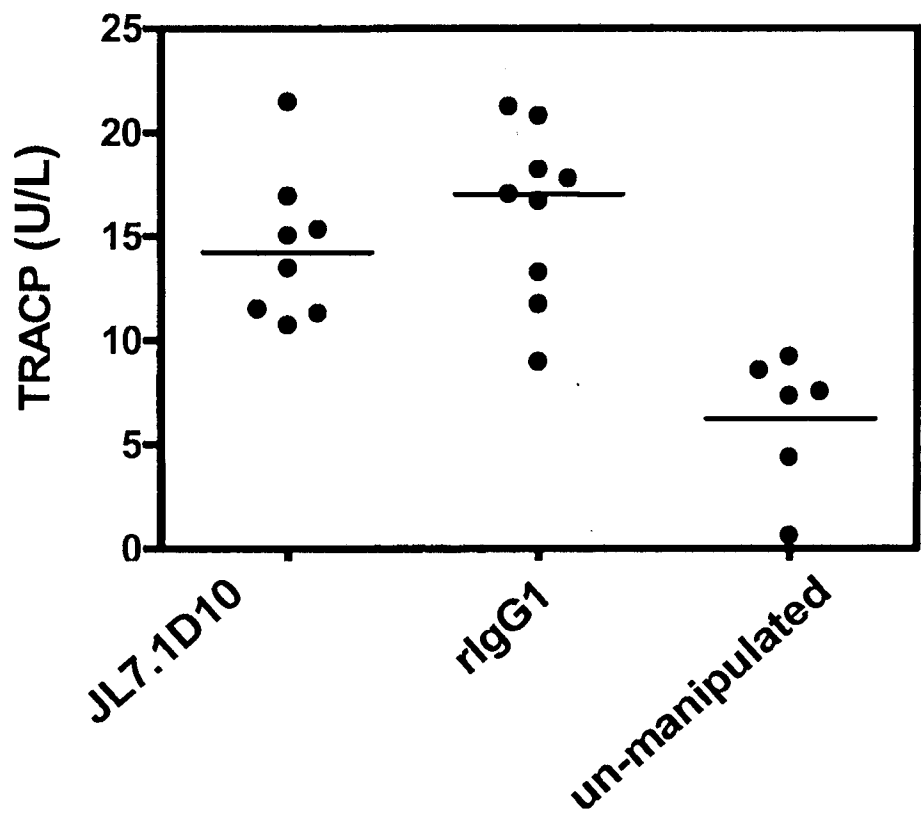


Figure 8

40

15/22

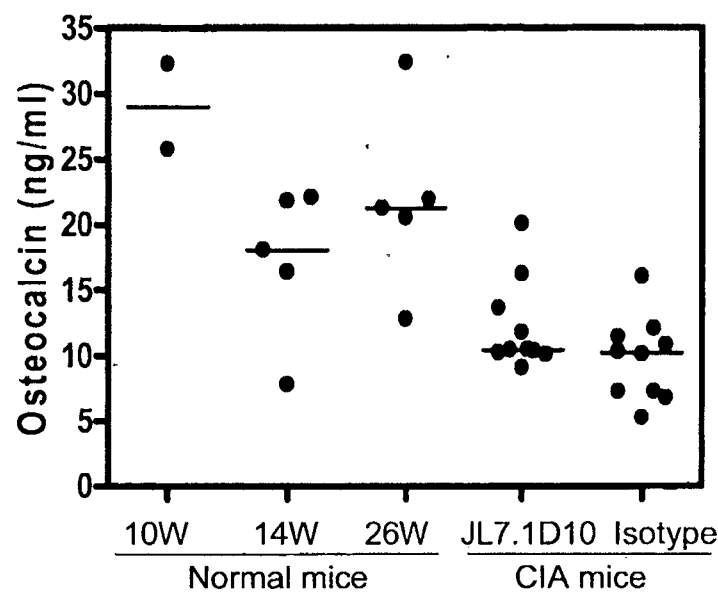


Figure 9

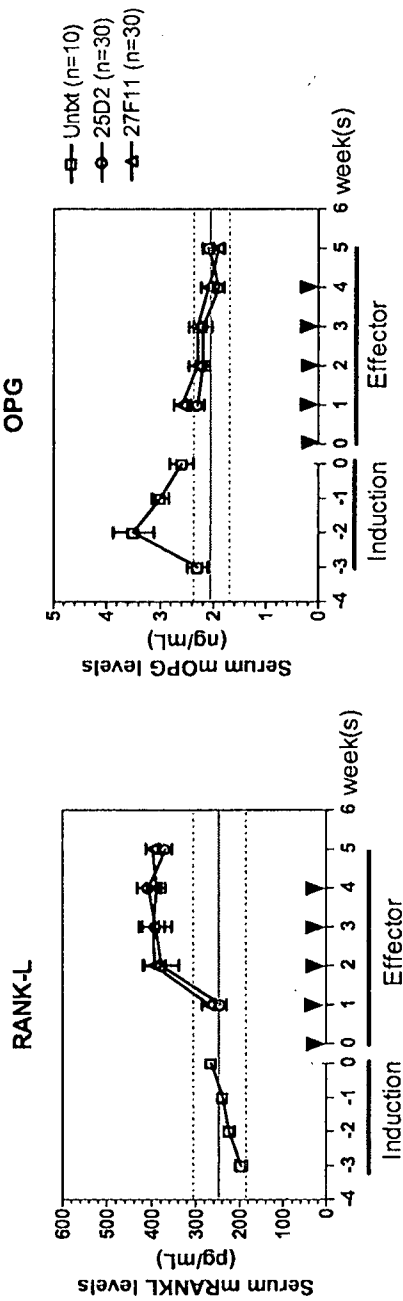


Figure 10

17/22

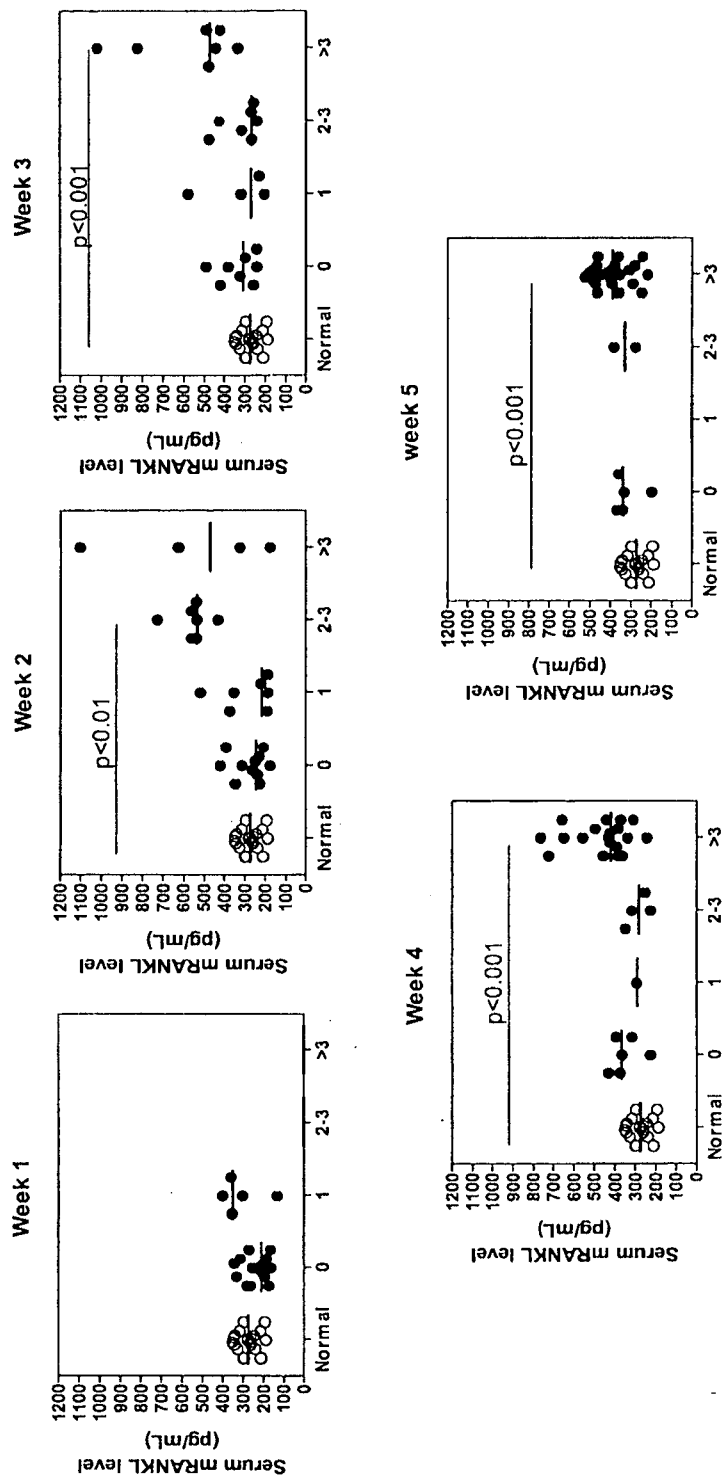


Figure 11

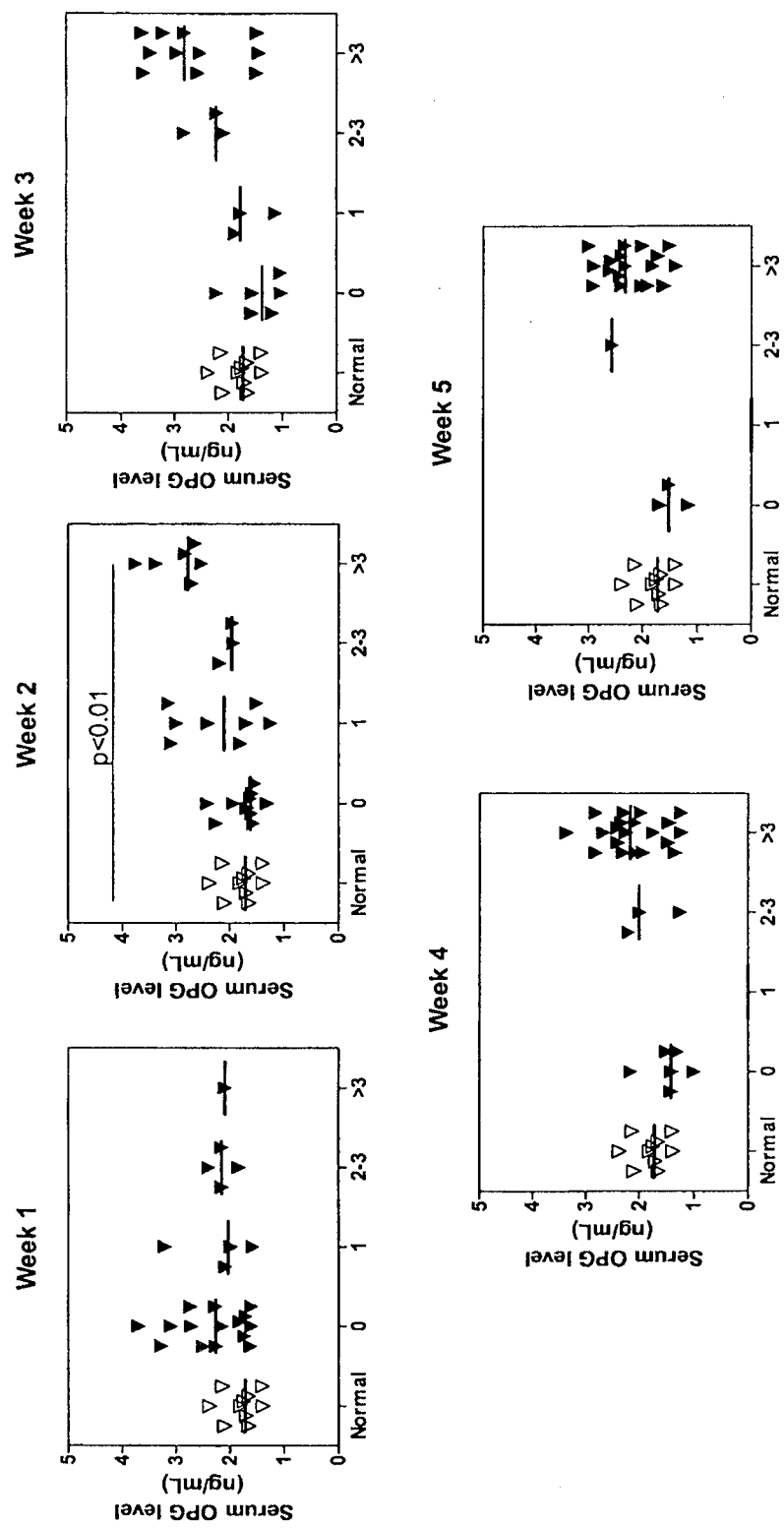


Figure 12

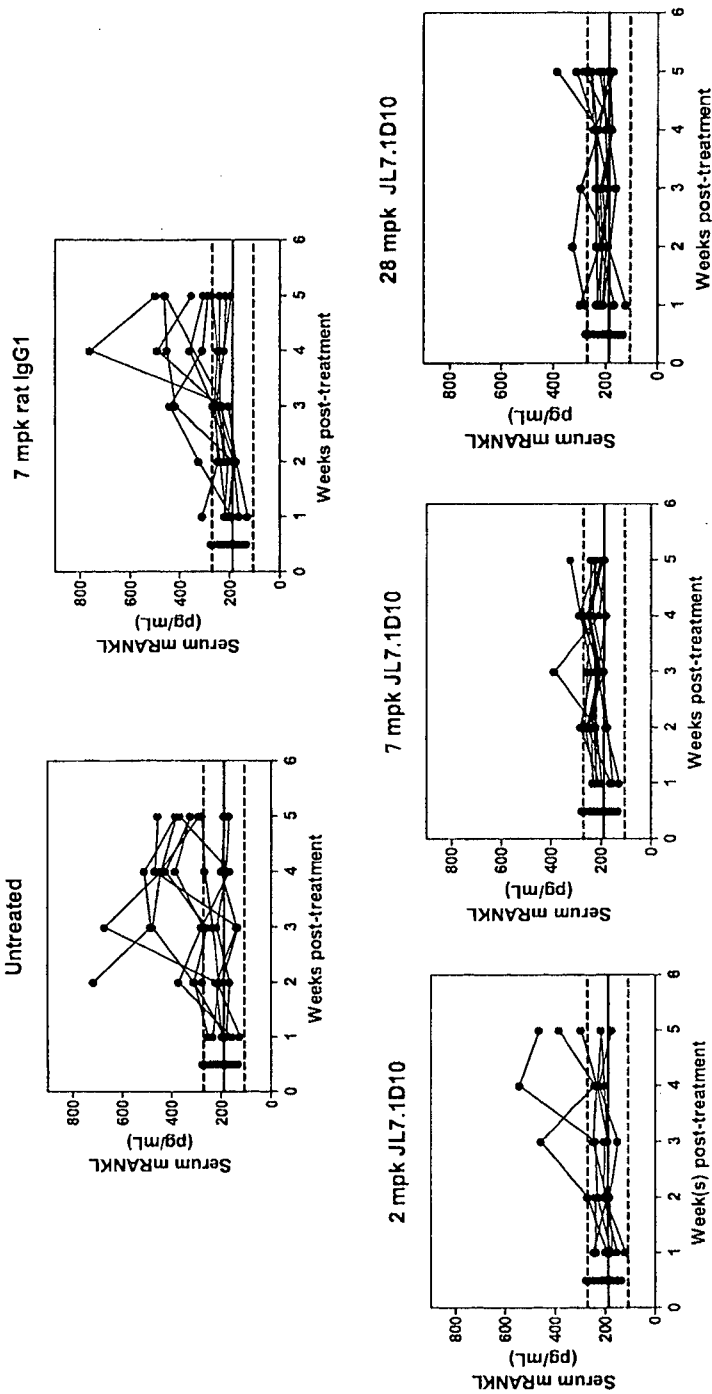


Figure 13

Handwritten signature

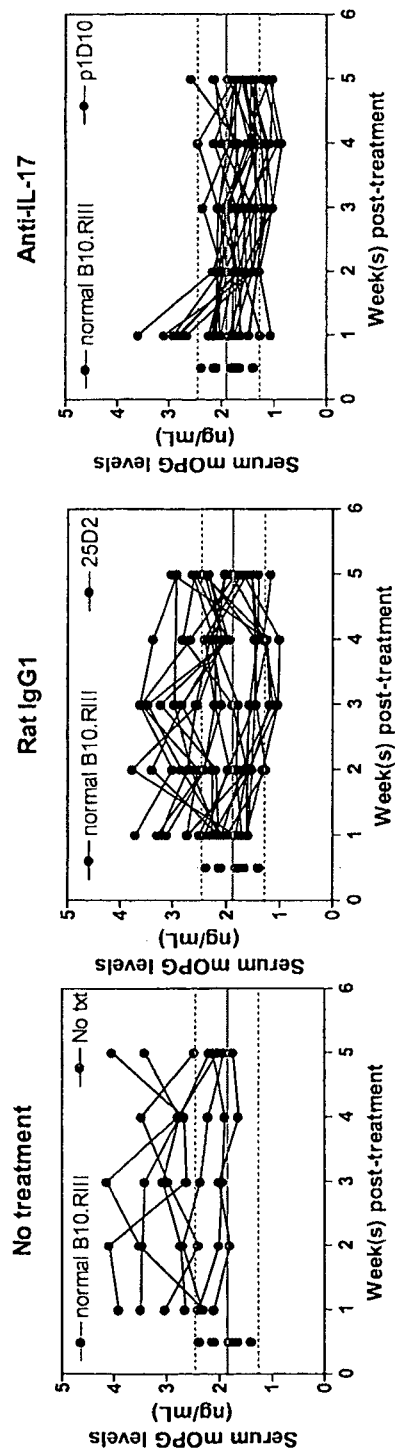


Figure 14

df

21/22

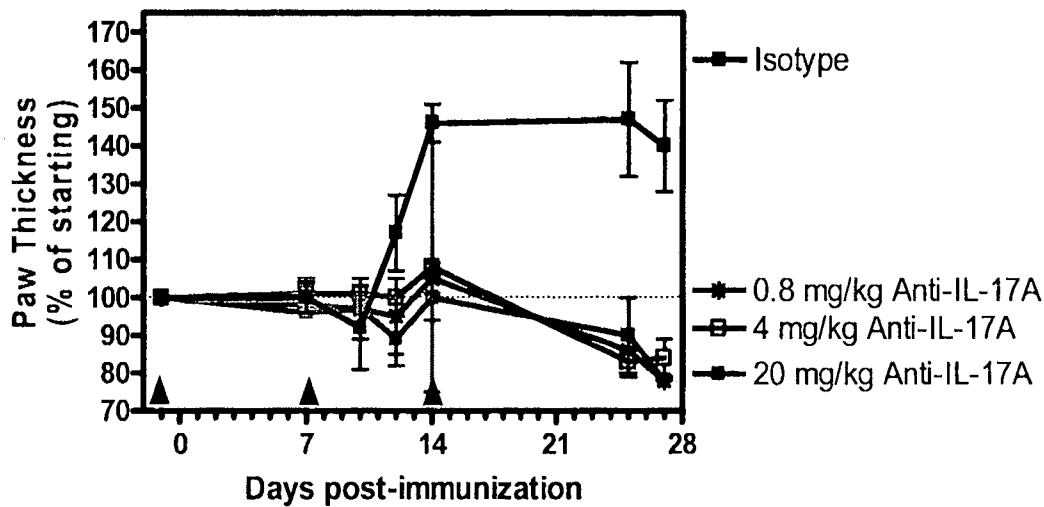


Figure 15

22/22

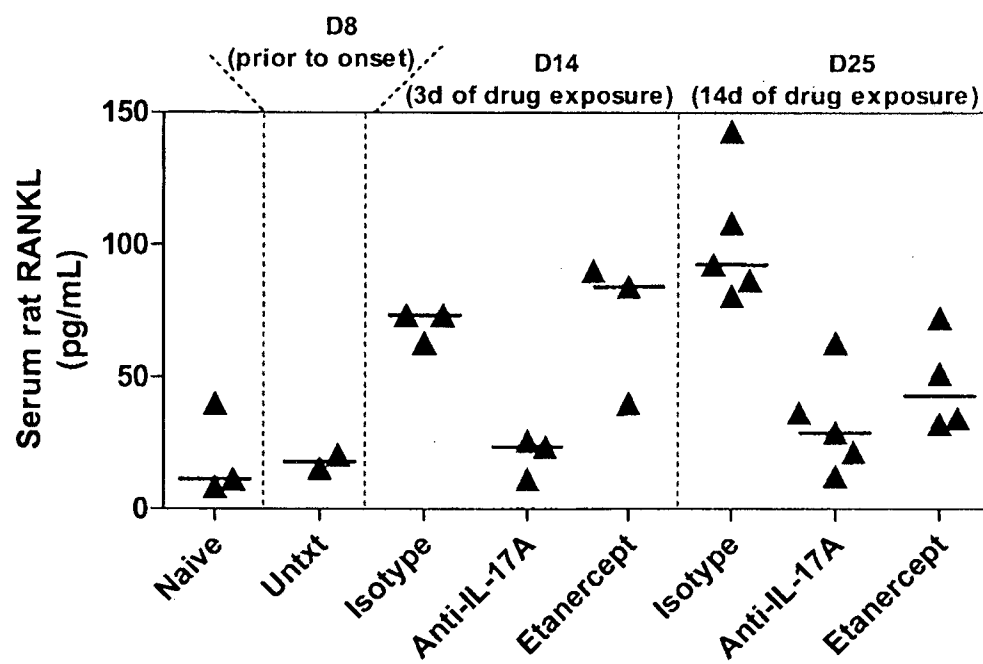


Figure 16

BP06679 Sequence Listing
SEQUENCE LISTING

<110> Bowman, Edward Paul
Chao, Cheng-Chi
Chen, Shi-Juan

<120> JOINT DESTRUCTION BIOMARKERS FOR ANTI-IL-17A THERAPY OF
INFLAMMATORY JOINT DISEASE

<130> BP06679

<140> To Be Assigned

<141> 2008-06-20

<150> 60/045,239

<151> 2007-06-20

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 220

<212> PRT

<213> Humanized Rat Antibody

<400> 1

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Phe Ser
20 25 30

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

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Thr Ser Thr Arg Gln Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Ser Tyr Tyr Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

195

BP06679 Sequence Listing

200

205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 2
<211> 454
<212> PRT
<213> Humanized Rat Antibody

<400> 2

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Pro Ser His
20 25 30

Ser Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Trp Asn Gln Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Phe Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asn Ala Tyr Ile Thr Asp Tyr Tyr Tyr Glu Asn Tyr Phe Met Asp
100 105 110

Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255

BP06679 Sequence Listing

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

**BIOMARCADORES DE DESTRUCCION DE ARTICULACIONES PARA
TERAPIA ANTI-INTERLEUCINA-17A DE REUMATISMO INFLAMATORIO**

La presente solicitud clama el beneficio de la solicitud de patente
5 provisional de los Estados Unidos 60/945239, presentada el 20 de junio del
2007.

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se relaciona en general con el tratamiento
de reumatismos inflamatorios con antagonistas de interleucina-17A (IL-17A).
Más en específico, la invención se relaciona con biomarcadores que se
relacionan con la eficacia de antagonistas de IL-17A para inhibir la
destrucción de articulaciones en artritis reumatoide y artritis asociadas.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad inflamatoria
ocasionada por la desregulación de del sistema inmune, que resulta en la
20 inflamación de las articulaciones, ocasionando dolor de articulaciones,
hinchazón y rigidez, con el desgaste progresivo de huesos y cartílago. La
combinación de inflamación y daño estructural de las articulaciones resulta en
una pérdida de función, la cual puede llevar a la incapacidad permanente.

IL-17A, cuyo nombre original fue antígeno 8 citotóxico asociado con linfocitos T (CTLA8) es una citosina homodimérica que se une a IL-17RA (también conocido como IL17R) e IL-17RC. Se cree que el receptor funcional para IL-17A es un complejo receptor multimérico que comprende uno o
5 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 posiblemente una tercera proteína, aún desconocida (Toy, D. et al., (2006) J. of Immunol. 177(1):36-39; datos no publicados).

IL-17A se produce mediante un subconjunto de células T
10 conocidas como células Th17, cuya diferenciación inicia mediante la señalización TGF-beta dentro del contexto de las citosinas proinflamatorias, en particular IL-6, IL-1-beta y TNF-alfa y cuyo mantenimiento y supervivencia dependen de la interleucina-23 (IL-23) (Langrish, C.L. et al. (2005), J. Exp. Med 201:233-240; Harrington, L.E., et al., (2005), Nat. Immunol. 6:1123-1132;
15 Veldhoen, M. et al., (2006) Immunity 24:179-189). IL-23 es una interleucina heterodimérica que comprende dos subunidades: p19, que es única a IL-23; y p40, que se comparte con IL-12. IL-23 media la señalización al unirse a un receptor heterodimérico, que comprende IL-23R e IL-12Rbeta1 (IL12RB1), el cual se comparte con el receptor de IL-12. Estudios en modelos de
20 enfermedad de murino sugieren que las células Th17 dependientes de IL-23 juegan un papel patogénico en enfermedades inflamatorias autoinmunes y crónicas (Langrish et al., supra, Park, H., et al. (2005), Nat. Immunol. 6:1133-1141).



L-17A está presente en el líquido sinovial en las etapas más tempranas de la enfermedad, junto con otros mediadores inflamatorios conocidos como TNF e IL-1 β . La expresión desregulada de IL-17A dentro de una articulación inflamada por sí sola y en sinergia con TNF e IL-1 β , estimula las proteasas múltiples en dirección 3', las quimiosinas y las citosinas proinflamatorias que en conjunto contribuyen al deterioro de cartílago y óseo. Una variedad de antagonistas biológicos de IL-17A utilizados en múltiples modelos de artritis en ratones ha demostrado que el bloqueo de IL-17A inhibe el avance de la artritis y la destrucción resultante de las articulaciones que se presenta con un énfasis especial en la conservación ósea (ver, por ejemplo, Koenders MI, et al., (2006) Ann. Rheum. Dis. 65 (Suppl. 3):29-33). Se está probando al menos un anticuerpo anti-IL-17A en ensayos clínicos de pacientes humanos con RA.

Actualmente, la evaluación del efecto de los fármacos antirreumáticos sobre el avance de la destrucción de articulaciones se basa principalmente en la evaluación radiográfica. No obstante, genera controversia el uso de datos radiográficos en ensayos clínicos (van der Heijde, D. et al, (2002) Arthritis Rheum 47;215-218). Además de consumir tiempo, la radiografía no es práctica en las etapas tempranas de RA en las cuales los síntomas que reflejan el proceso inflamatorio frecuentemente predominan sobre los síntomas relacionados con la destrucción de las articulaciones (Morozzi, G., et al, (2007) Clin Rheumatol.) Evidentemente, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), los cuales se han utilizado

tradicionalmente como terapias de primera línea para RA, son razonablemente eficaces para mejorar las señales y síntomas de la inflamación, pero tienen escasa eficacia en retardar la destrucción de las articulaciones, lo que lleva a la especulación que la inflamación y la posterior

5 destrucción de las articulaciones pueden no ir de la mano (van den Berg, WB (2001), *Semin Arthritis Rheum.* 30:7-16; Geusens, P.P., et al. (2006), *Arthritis & Rheumatism* 54 (6):1772-1777). Así, existe una necesidad clínica bien establecida por mejores herramientas para pronosticar el efecto de fármacos antirreumáticos en el daño estructural a articulaciones, y esfuerzos recientes

10 se han centrado en el desarrollo de varios marcadores de metabolismo de cartilago y/u óseo que se elevan en el suero u orina de pacientes con RA comparados con sujetos normales (Crnkic, M. et al., (2003) *Arthritis Res. Ther.* 5:R181-R185; Valleala, H., et al. (2003) *Eur. J. Endocrinol.* 148:527-530); Ziolkowska, M., et al. (2002) *Arthritis & Rheumatism* 46(7):1744-1753).

15 El cartilago articular en las articulaciones se compone por el proteoglicano agrecano, colágeno (tres cadenas α forman una hélice triple) y otras proteínas no colagenosas (por ejemplo la proteína oligomérica de matriz cartilaginosa (COMP) y la glicoproteína 39 de cartilago humano (HC gp-39), que se conoce también como YKL-40). El colágeno tipo I es un componente

20 principal del hueso y de otros tejidos; mientras que el colágeno tipo II se localiza específicamente en el cartilago articular de la articulación. En los extremos de las hélices de colágeno tipo I y II existen telopéptidos N- y C-terminales no helicoidales cortos que contienen enlaces cruzados covalentes



que conectan con otras cadenas α -, tanto dentro del mismo trímero como con los trímeros adyacentes. La escisión fisiológica y patológica del colágeno por parte de los MMP o de la catepsina K resulta en la generación de productos de degradación o neo epítopes (por ejemplo telopéptido de enlace cruzado C-terminal C2C, C1,2C de colágeno tipo I (CTX-I), telopéptido de entrelazado C-terminal de colágeno tipo II (CTX-II), telopéptido de entrelazado N-terminal de colágeno tipo I (NTX-I)), los cuales se liberan en el líquido sinovial, suero y orina. La escisión de la triple hélice de colágeno también libera las proteínas no colagenosas (por ejemplo COMP, YKL-40, agrecano) incorporadas previamente en las fibrillas de colágeno. Estas moléculas se elevan en el líquido sinovial y el suero bajo condiciones de remodelado normal y destrucción patológica de cartílago.

La destrucción de cartílago también resulta en una mayor síntesis compensadora de colágeno por parte de los condrocitos. El colágeno tipo I y II se sintetiza como una promolécula y una vez que está fuera de la célula la escisión de procolágeno libera propéptidos N-terminales y C-terminales. Los niveles de propéptido C-terminal de colágeno tipo II (CPII) se relacionan con la nueva síntesis de colágeno tipo II. La destrucción de cartílago también aumenta la síntesis de agrecano y la aparición de la "forma fetal" de agrecano que tiene el epítipo CS846. Mayores niveles de CS846 en el suero reflejan la síntesis del agrecano nuevo (comparado con la escisión de agrecano "viejo").

La destrucción ósea ocurre mediante la generación números
excesivos de osteoclastos que resorben el hueso mineralizado y degradan la
matriz orgánica del hueso desmineralizado. El activador receptor del ligando
de NF κ B (RANK) (RANKL) es una molécula de la superficie celular expresada
5 por las células T activadas, sinoviocitos similares a fibroblastos (FLS) y
osteoblastos, que es crítico para promover la diferenciación de de pre-
osteoclastos en osteoclastos maduros, los cuales son células que pueden
erosionar el hueso. RANKL puede ser eliminado mediante escisión
proteolítica (tanto la superficie celular como el RANKL soluble son activos) y
10 se eleva en artritis de ratones y en el suero humano con RA. El RANKL de
membrana o soluble se une a RANK en pre-osteoclastos y genera una señal
de diferenciación. La osteoprotegrina (OPG) es un antagonista natural de
este sistema al unirse a RANKL y prevenir su interacción con RANK sobre
pre-osteoclastos.

15 La isoforma 5b de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRACP)
se libera en el suero mediante osteocalstos que se resorben en el hueso
conforme transitan las proteínas degradadas de huesos de la superficie
resorbida por el hueso hacia afuera del hueso. Los niveles en suero de la
isoforma 5b de TRACP se elevan en enfermedades de resorción ósea. La
20 secuencia de aminoácido para TRACP5 se encuentra en el número de
acceso para NM_001102405, NM_001102404 o NM_007388.

Algunos de estos marcadores séricos del metabolismo óseo y
de cartílago (o destrucción) se elevan en pacientes con RA y tienen cierto

valor de pronóstico al identificar pacientes que están e mayor riesgo de tener una destrucción más agresiva de huesos. Por ejemplo, los niveles elevados de proteína de matriz oligomérica de cartílago (COMP) se han asociado con un avance radiográfico más agresivo (den Broeder, A. A., et al. (2002) Ann Rheum Dis 61(4): 311-318; Wollheim, F. A., et al. (1997) Br J Rheumatol 36(8): 847-8499; Skoumal, M., et al. (2003). Scand J Rheumatol 32(3):156-161; Mansson, B., et al. (1995), J Clin Invest 95(3):1071-1077; Lindqvist, E., et al. (2005) Ann Rheum Dis 64(2):196-201; Forslind, K., et al. (1992) Br J Rheumatol 31(9): 593-598; Fex, E., et al. (1997) Br J Rheumatol 36(11):1161-1165. También, una baja relación de OPG/RANKL predijo un mayor avance radiográfico en un lapso de cinco años (Geusens, P. P. et al. (2006) Arthritis Rheum 54(6):1772-1777) y niveles elevados de CTX-I y CTX-II se asociaron con un incremento a cuatro años en la puntuación Sharp en pacientes con manifestación temprana de RA (Garnero, P., et al. (2002) Arthritis Rheum 46(11):2847-2856).

No obstante, los inventores de la presente no tienen conocimiento de estudios publicados que concluyan que el bloqueo de IL-17A pueda inhibir la erosión ósea y modular los niveles séricos de cualesquiera de las proteínas anteriores en animales con artritis severa. Así, existe una necesidad de identificar biomarcadores que se relacionan con la inhibición de la destrucción de los biomarcadores que se relacionan con la inhibición de la destrucción de las articulaciones por parte de la terapia anti-IL-17A.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el descubrimiento que los niveles séricos de COMP, OPG y RANKL en ratones con artritis inducida por colágeno (CIA) después del tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-IL-17A (Mab) se modulan mediante terapia anti-IL-17A. Los inventores también descubrieron que los niveles séricos de RANKL en ratones con CIA disminuyen con mayores dosis del Mab anti-IL-17A y alcanzan niveles normales en dosis de anticuerpos que son eficaces para inhibir la destrucción de articulaciones en los ratones con CIA como se mide mediante técnicas histológicas y de μ -CT tradicionales. Con base en estos resultados con COMP, OPG y RANKL en el modelo de artritis de ratones con CIA, los inventores en la presente creen que estos marcadores probablemente sean útiles como marcadores sustitutos, es decir biomarcadores del efecto de la terapia anti-IL-17A sobre la destrucción de articulaciones en reumatismos inflamatorios como RA y artritis asociadas. También, estos datos obtenidos en ratones artríticos sustentan el uso de otros marcadores del metabolismo de cartílago y óseo que están elevados en pacientes humanos con RA, incluyendo CTX-I, CTX-II y HC gp-39, como marcadores sustitutos para monitorear el efecto de la terapia anti-IL-17A en la destrucción de articulaciones en pacientes con reumatismo inflamatorio.

Adicionalmente, se ha descubierto previamente que la terapia anti-IL-17A es eficaz para inhibir la destrucción de articulaciones en el modelo

de artritis con CIA, incluso cuando tal terapia no produce una mejora aparente en inflamación (WO2008/021156). Así, se espera que la terapia anti-IL-17A será útil para inhibir la erosión ósea continua en pacientes humanos quienes hayan sido tratados previamente con un agente antirreumático diferente, sin importar si el agente previo ha reducido las señales y síntomas de inflamación o no. Así, el presente descubrimiento de marcadores no relacionados con inflamación que se relacionan con la inhibición de la erosión ósea mediante terapia con IL-17A ofrece métodos y productos novedosos para tratar a pacientes con con erosión ósea quienes son no respondedores inflamatorios o respondedores inflamatorios a terapia antirreumática previa.

En consecuencia, un aspecto de la presente invención es un método para seleccionar a un paciente con un reumatismo inflamatorio para tratamiento con un antagonista de IL-17A. El método de selección del paciente comprende comparar el(los) nivel(es) de al menos un biomarcador de destrucción de articulaciones en una muestra de suero tomada del sujeto con la escala normal de niveles séricos para el biomarcador y seleccionar el paciente para tratamiento con el antagonista de IL-17A si el(los) nivel(es) del biomarcador de destrucción de articulaciones en la muestra sérica del sujeto está fuera de la escala normal.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para pronosticar la eficacia de de un antagonista de IL-17A para inhibir la erosión ósea en un sujeto con reumatismo inflamatorio. Este método de predicción de eficacia comprende determinar los niveles de al menos un biomarcador de

100

destrucción de articulaciones de muestras séricas tomadas de sujetos previo a y al final de un período de tratamiento inicial con el antagonista de IL-17A y comparar los niveles del biomarcador en estas muestras séricas previo al tratamiento y posterior al tratamiento. Una normalización en el nivel de biomarcador durante el período de tratamiento inicial pronostica que el antagonista de IL-17A probablemente será eficaz en inhibir la destrucción de articulaciones en el sujeto. En una modalidad preferida, el método de predicción comprende además determinar el nivel del biomarcador en una tercera muestra sérica tomada del sujeto al final de un período de tratamiento posterior con el antagonista de IL-17A; si el nivel del biomarcador en la tercera muestra sérica es más normalizado que el nivel del biomarcador en la segunda muestra sérica, entonces se pronostica que el antagonista IL-17A será eficaz para inhibir la destrucción de articulaciones en el sujeto. Períodos de tratamiento iniciales preferidos son de al menos una semana, al menos dos semanas, al menos cuatro semanas, al menos ocho semanas, al menos doce semanas, al menos 24 semanas, o al menos 48 semanas, mientras que períodos de tratamientos posterior son al menos de 12 semanas, al menos 24 semanas o al menos 48 semanas. En algunas modalidades, el sujeto es un animal no humano con artritis, que puede estar naturalmente presente o inducido experimentalmente. Sujetos no humanos preferidos incluyen ratones o ratas con CIA con artritis inducida por adyuvantes (AIA). En otras modalidades, el sujeto es un humano con artritis.

101

En un aspecto incluso adicional la presente invención proporciona un método para tratar un sujeto con reumatismo inflamatorio con un antagonista de IL-17A. Este método de tratamiento comprende determinar, en una primera muestra sérica tomada del sujeto, el nivel de al menos un biomarcador de destrucción de articulaciones, administrar el antagonista de IL-17A al sujeto de conformidad con un primer régimen de dosificación durante un período de tratamiento inicial, determinar el nivel de los biomarcadores seleccionados en al menos una segunda muestra sérica tomada del paciente al final del período de tratamiento inicial y comparar los niveles del biomarcador en la primera y segundas muestras séricas.

Si el nivel del biomarcador en la segunda muestra sérica está dentro de una escala especificada, entonces el sujeto se trata con el antagonista de IL-17A de conformidad con el primer régimen de dosificación durante al menos un período de tratamiento posterior. No obstante, si el nivel del biomarcador en la segunda muestra sérica está fuera de la escala especificada, por ejemplo que indica que puede ser necesaria una terapia más agresiva para lograr la inhibición de la destrucción de articulaciones, entonces se trata el sujeto con el antagonista de IL-17A de conformidad con un segundo régimen de dosificación durante al menos un período de tratamiento posterior, en donde el segundo régimen de dosificación comprende administrar una cantidad total del antagonista de IL-17A durante el período de tratamiento posterior que sea mayor que la cantidad total administrada durante el período de tratamiento inicial.

En una modalidad preferida de este método de tratamiento, la escala especificada es la escala normal, es decir la escala de niveles séricos del biomarcador encontrado en una población de sujetos saludables, coincidentes en género y edad. En otra modalidad preferida, la escala

5 especificada para nivel sérico del biomarcador se define por un intervalo de seguridad de al menos 80% del nivel promedio en suero del biomarcador en una población de sujetos con la enfermedad inflamatoria quienes se trataron con el mismo antagonista IL-17A de conformidad con el mismo régimen de dosificación por un período igual a o mayor que el período de tratamiento

10 inicial, en donde la población mostró la inhibición de destrucción de articulaciones después del tratamiento con el antagonista de IL-17A de conformidad con el primer régimen de dosificación durante un período igual o mayor que el período de tratamiento posterior.

En una modalidad preferida, cuando el nivel del biomarcador en

15 la segunda muestra sérica indica que se requiere una terapia anti-IL-17A más agresiva, se trata al sujeto con una cantidad total mayor del antagonista durante los períodos del tratamiento posterior al administrar el antagonista de IL-17A en mayores dosis y/o en intervalos más frecuentes que las dosis e intervalos más frecuentes que las dosis e intervalos empleados durante el

20 período de tratamiento inicial.

En otra modalidad preferida, el método de tratamiento también comprende administrar un antagonista de IL-23 durante cada uno de los períodos de tratamiento inicial y de tratamiento posteriores, o durante solo un

período de tratamiento posterior. El antagonista de IL-23 puede inhibir la expresión de ya sea la subunidad de la citosina (IL-23p19 o p40), ya sea la subunidad del receptor funcional (IL-23R o I-12beta1), o puede inhibir la señalización de IL-23 al interactuar directa o indirectamente con uno o más de
5 estos polipéptidos para evitar una interacción funcional de ligando-receptor. En algunas modalidades preferidas, el antagonista de IL-23 es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a e inhibe la actividad de ya sea IL-23p19 o IL-23R. En una modalidad particularmente preferida, el antagonista de IL-23 es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a IL-
10 23p19.

La invención también proporciona un kit para tratar un reumatismo inflamatorio. El kit comprende una composición farmacéutica de un antagonista de IL-17A y reactivos para medir el nivel de al menos un biomarcador de destrucción de articulaciones en una muestra sérica tomada
15 de un sujeto.

La invención también proporciona un producto de fármaco fabricado para tratar un reumatismo inflamatorio, que comprende una formulación farmacéutica que comprende un antagonista de IL-17A e instrucciones para determinar niveles séricos en el paciente de al menos un
20 biomarcador de destrucción de articulaciones antes y durante el tratamiento con el antagonista de IL-17A.

Incluso otro aspecto de la invención es el uso de un antagonista de IL-17A para preparar un medicamento para tratar a un paciente que tiene

101

un reumatismo inflamatorio para inhibir la destrucción de articulaciones, en donde el paciente tiene un nivel sérico anormal de al menos un biomarcador de destrucción de articulaciones después del tratamiento previo con una terapia antirreumática diferente. En una modalidad preferida, el medicamento

5 es para administrar el antagonista de IL-17A de conformidad con cualquiera de los regímenes de tratamiento descritos aquí.

En cada uno de los aspectos anteriormente descritos de la invención, el antagonista de IL-17A puede inhibir la expresión de IL-17A o IL-17RA o IL-17RC o puede inhibir la señalización de IL-17A al interactuar

10 directa o indirectamente con uno o más de estos polipéptidos para prevenir una interacción funcional de ligando-receptor. En algunas modalidades preferidas, el antagonista de IL-17A es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a e inhibe la actividad de ya sea IL-17A, IL-17RA o IL17RC. En una modalidad particularmente preferida, el antagonista de IL-

15 17A es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a IL-17A. En una modalidad preferida, el antagonista de IL-17A es un anticuerpo biespecífico que se une a e inhibe la actividad de IL-23p19 e IL-17A; IL-23p19 e IL-17RA; IL-23R e IL-17A; IL-23R e IL-17RA, IL-23p19 e IL-17RC; o IL-23R e IL17RC. En otra modalidad preferida, el antagonista de IL-17A es un

20 anticuerpo bi-específico que se une a e inhibe la actividad de IL-23p19 e IL-17A.

En cada uno de los aspectos descritos anteriormente de la invención, biomarcadores de destrucción de articulaciones preferidos son la

isoforma 5b de COMP, CTX-I, CTX-II, HC gp-39, OPG, RANKL, TRACP) y osteocalcina. Cualquiera de estos biomarcadores o cualquier combinación de dos o más, o los seis biomarcadores pueden emplearse. COMP, OPG y RANKL son biomarcadores más preferidos, siendo RANKL el biomarcador más preferido.

Reumatismos inflamatorios preferidos que pueden tratarse utilizando cualquiera de los aspectos anteriores de la invención son artritis reumatoide (RA), artritis psoriática (PsA) o espondilitis anquilosante, con artritis reumatoide siendo un reumatismo inflamatorio particularmente preferido.

También, en cada uno de los aspectos descritos arriba de la invención, el sujeto con el reumatismo inflamatorio puede ser uno que sea un paciente que no responde inflamatorio, un Paciente inflamatorio que responde, un Paciente inflamatorio que responde moderado o un Paciente inflamatorio que responde adecuado al antagonista de IL-17A o a un fármaco antirreumático diferente.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La figura 1A muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de anticuerpo anti-IL-17A humanizado 16C10 de conformidad con la presente invención SEQ ID NO:1. Se indican los CDR.

La figura 1B muestra la secuencia de aminoácidos para la cadena pesada de anticuerpos anti-IL-17A humanizados 16C10 de conformidad con la presente invención SEQ ID NO: 2. Se indican CDR.

Las figuras 2A-2D demuestran los efectos de tratamientos de anticuerpos anti-IL-17A sobre la patología en el modelo de ratón con CIA de artritis reumatoide. Los tratamientos incluyen la administración de anticuerpos anti-IL-17A JL7.1D10 (a 28, 7, y 2 mg/kg) y administración de un control de isotipo (7 mg/kg).

La figura 2A presenta la puntuación de severidad de enfermedad visual (DSS), una medición de hinchazón y enrojecimiento visual de la pata, en función del tratamiento con anticuerpo. La puntuación es: 0 = pata parece la misma que la pata de control (sin tratar); 1 = inflamación de un dedo en una pata dada; 2 = inflamación de dos dedos en la palma de una pata dada; 3 = inflamación de la palma y dedos de una pata dada.

La figura 2B presenta el daño de cartílago (por histopatología) en función de un tratamiento con anticuerpo. La puntuación es 0 = normal; 1 = mínima, 2 = leve; 3 = moderada; 4 = severa.

La figura 2C presenta la erosión ósea (por histopatología) en función de un tratamiento con anticuerpo. La puntuación es 0 = normal; 1 = mínima 2 = leve; 3 = moderada; 4 = severa.

La figura 2D presenta la erosión ósea (por histopatología) para patas de ratones con CIA que alcanzaron una puntuación de 2 o 3 en DSS visual, es decir patas altamente inflamadas. rIgG1 es un anticuerpo de control

102

de isotipo. La puntuación es: 0 = normal; 1 = mínima, 2 = leve; 3 = moderada; 4 = severa.

Las figuras 3A-3D presentan datos que muestran el efecto de un anticuerpo anti-IL-17A sobre niveles séricos de COMP en ratones artríticos.

5 La figura 3A muestra los niveles séricos de COMP en ratones atados con control de isotipo o un anticuerpo anti-IL-17A (JL7.1D10). La barra horizontal sólida denota el nivel sérico de COMP promedio en animales no tratados (círculos grisáceos en el lado izquierdo de las gráficas) y las dos barras horizontales punteadas denotan desviaciones estándar ± 2 del

10 promedio de ratones sin enfermedad.

La figura 3AA presenta niveles séricos de COMP en ratones no enfermos (normales) o en ratones con CIA tratados semanalmente durante 5 semanas con un control de isotipo o un anticuerpo anti-IL-17A (JL7.1D10) a una dosificación de 28 mg/kg o 7 mg/kg.

15 La figura 3B presenta niveles séricos de COMP en ratones no enfermos (sin manipular) y severamente artríticos tratados con control de isotipo a corto plazo (rlgG1) o anticuerpos anti-IL-17A (JL7.1D10).

La figura 4 presenta niveles séricos de RANKL en ratones artríticos que no fueron tratados, tratados con un control de isotipo o tratados

20 con una de tres dosis de un anticuerpo anti-IL-17A (JL7.1D10). La barra horizontal sólida denota el nivel sérico de COMP promedio en animales no enfermos (círculos grises en el lado izquierdo de las gráficas) y las dos barras

109

horizontales punteadas denotan desviaciones estándar ± 2 del promedio de ratones no enfermos.

La figura 5 presenta niveles séricos de OPG en ratones normales (círculos grises) o en ratones artríticos que no fueron tratados (sin dosificación), tratados con un control de isotipo (IgG1 de rata), o tratados con un anticuerpo anti-IL-17A.

La figura 6 presenta niveles séricos de OPG y RANKL en ratones normales (círculos grises) o en ratones severamente artríticos después de una exposición a corto plazo a un control de isotipo (rlgG1) o a un anticuerpo anti-IL-17A (JL7.1D10).

La figura 7 presenta rayos X micro-CT de una pata de ratones no inflamada, y de patas severamente inflamadas de ratones artríticos tratados con un anticuerpo de control de isotipo o un anticuerpo anti-IL-17A.

La figura 8 presenta niveles séricos de TRACP en ratones no enfermos (sin manipular) y severamente artríticos y tratados con control de isotipo a largo plazo (rlgG1) de un anticuerpo anti-IL-17A (JL7.1D10).

La figura 9 presenta niveles de osteocalcina sérica en ratones normales y en ratones con CIA tratados con un anticuerpo anti-IL-17A (JL7.1D10) o un anticuerpo de control de isotipo.

La figura 10 muestra el cambio dinámico en niveles séricos de RANKL (panel izquierdo) y OPG (panel derecho) en una cohorte de ratones con avance a través del modo de CIA en ratones con las líneas horizontales indicando media (línea no interrumpida) $\pm$ desviación estándar (líneas

100

interrumpidas) en ratones sanos no manipulados y dosificación de anticuerpo denotada como cabezas de flecha.

La figura 11 muestra una concentración sérica de RANKL contra el DSS total animal de ratones normales o con CIA en cada una de las cinco
5 semanas de tratamiento con un anticuerpo de control de isotipo IgG1.

La figura 12 muestra la concentración sérica de OPG contra DSS total animal de ratones individuales o con CIA en cada una de las cinco semanas de tratamiento con un anticuerpo de control de isotipos de IgG1.

La figura 13 muestra los niveles séricos de RANKL en ratones
10 individuales con CIA que no se trataron o se trataron con cinco dosis subcutáneas semanales de un anticuerpo de control de isotipo (IgG1 de rata) o un anticuerpo anti-IL-17A (JL7.1D10) a 2, 7, o 28 mg/kg.

La figura 14 muestra los perfiles séricos de OPG para ratones individuales con CIA que no se trataron o se trataron con 5 dosis subcutáneas
15 semanales de 7 mg/kg de un anticuerpo de control de isotipo (IgG1 de rata) o 28 mg/kg de un anticuerpo anti-IL-17A (JL7.1D10).

La figura 15 muestra el espesor de las patas en ratas con artritis inducida por adyuvante (AIA) que se trataron previamente a la inyección del adyuvante con un anticuerpo de isotipo o con las dosis indicadas de un
20 anticuerpo anti-rata IL-17A (JL8.18E10).

La figura 16 ilustra el efecto de la terapia anti-IL-17A o anti-TNF sobre niveles séricos de RANKL a los días 14 y 25 después de la exposición al fármaco en ratas individuales con AIA establecido.

110

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

I. Definiciones

Para que la invención pueda entenderse más fácilmente, ciertos
5 términos técnicos y científicos se definen específicamente a continuación. Al
menos que se definan específicamente en este documento, todos los
términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el significado entendido
comúnmente por un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención.

Como se utiliza en la presente, incluyendo las reivindicaciones
10 anexas, las formas y singulares de palabras como “un”, “una”, y “el” incluyen
su referencia plural correspondiente a menos que el contexto dicte claramente
lo contrario.

“Anormal” en el contexto del nivel sérico de un biomarcador de
destrucción de articulaciones quiere decir que el nivel sérico está fuera de la
15 escala normal para el biomarcador.

“Espondilitis anquilosante” o “AS” es una forma de inflamación
crónica de la columna y las articulaciones sacroíleas, que se ubican en la
espalda baja en donde el sacro (el hueso directamente encima del cóccix) se
une con los huesos iliacos (huesos a ambos lados de los glúteos superiores).
20 La inflamación crónica en estas áreas ocasiona dolor en y alrededor de la
columna. Al paso del tiempo, la inflamación espinal crónica (espondilitis)
puede llevar a una fusión completa (cementado) de las vértebras, un proceso
denominado anquilosis. La anquilosis lleva la pérdida de movilidad de la

10

columna. La espondilitis anquilosante es también una enfermedad reumática sistémica, quiere decir que puede afectar otros tejidos a lo largo del cuerpo. En consecuencia, puede ocasionar la inflamación en o lesión a otras articulaciones lejos de la columna, así como otros órganos, como los ojos, corazón, pulmones y riñones.

“Antagonista” quiere decir cualquier molécula que puede prevenir, neutralizar, inhibir o reducir una actividad meta, es decir la actividad de una citosina como IL-17A, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Los antagonistas de citosina incluyen, sin restricción, anticuerpos antagonísticos, péptidos, miméticos de péptidos, polipéptidos y moléculas pequeñas que se unen a una citosina (o a cualquiera de sus subunidades) o a su receptor funcional (o a cualquiera de sus unidades) de manera que interfiera con la transducción de señal de citosina y la actividad hacia el extremo 3'. Ejemplos de polipéptidos y antagonistas de polipéptidos incluyen versiones truncadas o fragmentos de receptor de citosina (por ejemplo dominios extracelulares solubles) que se unen a la citosina de manera que reduzca la cantidad de citosina disponible para unirse a su receptor funcional o que evite de otra manera que la citosina se una a su receptor funcional. Antagonistas también incluyen moléculas que evitan la expresión de cualquier subunidad que comprenda la citosina o su receptor, como por ejemplo oligonucleótidos anti-sentido que se concentran en ARNm, y ARN, mensajero de interferencia (ver 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*

112

99:55-77; Wang, *et al.* (2003) *Antisense Nucl. Acid Drug Devel.* 13:169-189).

El efecto inhibidor de un antagonista puede medirse mediante técnicas rutinarias. Por ejemplo para evaluar el efecto inhibidor sobre la actividad inducida por citosina, las células humanas que expresan un receptor funcional para una citosina se tratan con la citosina y la expresión de genes conocidos como activados o inhibidos por esa citosina se miden en presencia o ausencia de un antagonista potencial. Antagonistas útiles en la presente invención inhiben la actividad objetivo en al menos 25%, preferiblemente en al menos 50%, más preferiblemente en al menos 75% y más preferiblemente en al menos 90% cuando se compara con un control adecuado.

“Anticuerpo” se refiere a cualquier forma de anticuerpo que muestra la actividad biológica deseada, como inhibir la unión de un ligando a su receptor, o al inhibir la señalización inducida por ligando de un receptor. Así, “anticuerpo” se utiliza en el sentido más alto y avanza específicamente, sin restricción, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales y anticuerpos multi-específicos (por ejemplo anticuerpos bi-específicos).

“Fragmento de anticuerpo” y “fragmento de unión anticuerpo” quieren decir fragmentos de unión antígenos y análogos de un anticuerpo, que incluyen típicamente al menos una porción la unión a antígeno o regiones variables (uno o más CDR) del anticuerpo parental. Un fragmento de anticuerpo retiene al menos algo de la especificidad de unión del anticuerpo parental. Típicamente, un fragmento del anticuerpo retiene al menos 10% de

113

la actividad de unión parental cuando esa actividad se expresa en base molar.

Preferiblemente, un fragmento de anticuerpo retiene al menos 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% ó 100% o más del anticuerpo parental para el objetivo.

Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, sin restricción fragmentos

- 5 Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; dia-cuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos de cadena individual, por ejemplo sc-Fv; y anticuerpos multi-específicos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Variantes de anticuerpo diseñadas se repasan en Holliger y Hudson (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1126-1136.

- 10 Un "fragmento Fab" comprende una cadena ligera y C_H1 y regiones variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

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

- 20 Un "fragmento Fab' " contiene una cadena ligera y una porción de una cadena pesada que contiene el dominio V_H y también el dominio C_H1 y la región entre los dominios C_H1 y C_H², de manera tal que un enlace disulfuro entre cadenas puede formarse 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} , tal que un enlace disulfuro entre cadenas se forma entre las dos cadenas pesadas. Un fragmento $F(ab')_2$ se compone así de dos fragmentos Fab' que se mantienen juntos mediante un enlace disulfuro entre las dos cadenas pesadas.

La "región F_v " comprende las regiones variables para ambas cadenas pesada y ligera, pero sin las regiones constantes.

Un "anticuerpo F_v de cadena individual (o anticuerpo " scF_v ")" se refiere a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido individual. En general, el polipéptido F_v comprende además un enlazador de polipéptidos entre los dominios V_H y V_L que permite al scF_v formar la estructura deseada para unión a antígeno. Para un repaso de scF_v , ver Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315. Ver también la publicación de Solicitud de Patente Internacional No. WO 88/01649 y las patentes de E.U.A. No. 4,946,778 y 5,260,203.

Un "diacuerpo" es un fragmento de anticuerpo pequeño con dos sitios de unión 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 de polipéptido (V_H-V_L o V_L-V_H). Al utilizar un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en

1/5

la misma cadena, se fuerzan los dominios a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y creando sitios de unión antígeno. Los dímeros se describen más a cabalidad en EP 404,097; WO 93/11161; y Holliger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448.

- 5 Un “fragmento de anticuerpo de dominio” es un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional que contiene solo la región variable de una cadena pesada o la región variable de una cadena ligera. En algunos casos, dos o más regiones V_H se unen covalentemente con un enlazador de péptido para crear un fragmento de anticuerpo de dominio
- 10 bivalente. Las regiones V_H de un fragmento de anticuerpo bivalente pueden enfocarse en los mismos o diferentes antígenos.

“Fármaco antirreumático” es un fármaco utilizado para tratar artritis reumatoide. Las clases principales de fármacos antirreumáticos se describen a continuación.

- 15 “Fármacos antiinflamatorios no esteroideos” o “NSAID” son fármacos con efectos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios – reducen dolor, la fiebre e inflamación. Los NSAID se utilizan para proporcionar alivio sintomático a RA, pero tiene un efecto limitado en la pérdida progresiva de hueso y cartílago asociada con artritis reumatoide. NSAID incluyen salicilatos,
- 20 ácidos arilalcanoicos, ácidos 2-arilpropiónicos (profenos), ácidos N-arilantranílicos (ácidos fenámicos), oxicams, coxibs, y sulfonanilidas. NSAID comunes incluyen: ibuprofeno, naproxeno e indometacina.

116

“Corticosteroide” son análogos sintéticos de cortisona y se utilizan para reducir la inflamación y suprimir la actividad del sistema inmune. Los más prescritos comúnmente son prednisona y dexametasona.

“Fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad” o

5 “DMARD” son fármacos que influyen en el proceso de la enfermedad en sí. DMARD que se conoce también como fármacos de remisión, también tienen efectos antiinflamatorios y la mayor parte de éstos se tomaron a partir del tratamiento de otras enfermedades, como cáncer y malaria. DMARD incluyen cloroquina, hidroxiclороquina, metotrexato, sulfasalazina, ciclosporina,

10 azatioprina y ciclofosfamida, azatioprina, sulfasalazina, penicilamina y compuestos orgánicos con oro como aurotioglucosa, tiomalato de oro y sodio y auronofina. DMARD también incluyen agentes dirigidos contra citosinas pro-inflamatorias y sus receptores, como los inhibidores TNF-alfa. Ejemplos de antagonistas TNF que se han aprobado para tratar RA, incluyen Infliximab

15 (Remicade®, Centocor, Malvern, PA), Etanercept (Enbrel®, Amgen, Thousand Oaks, CA), y Adalimumab (Humira®, Abbott Laboratorios, Abbott Park, IL). Los antagonistas de IL-17A también podrían clasificarse como DMARD.

“Fármacos antirreumáticos de actuación lenta” o “SAARD” son

20 una clase especial de DMARD y el efecto de estos fármacos es de actuación lenta y no es tan rápidamente aparente como los de NSAID. Ejemplos de SAARD son hidroxiclороquina y aurotioglucosa.

117

“Fármacos citotóxicos inmunosupresores” o “fármacos inmunosupresores” son fármacos antirreumáticos utilizados típicamente para reumatismos inflamatorios si el tratamiento previo con NSAID y SAARD no tuvo efecto. Ejemplos de fármacos inmunosupresores son: metatrexato, 5 mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucil, y azatioprina.

“Compuesto de unión” se refiere a una molécula, molécula pequeña, macromolécula, anticuerpo, un fragmento o análogo de estos, o receptor soluble, capaz de unirse a un objetivo especificado. “Compuesto de unión” también puede referirse a cualquiera de los siguientes que sean 10 capaces de unión al objetivo especificado: un complejo de moléculas (por ejemplo complejo molecular no covalente); una molécula ionizada; y una molécula modificada covalente o no covalente (por ejemplo modificada por fosforilación, acilación, entrelazado, ciclación o escisión limitada. En casos en los que el compuesto de unión puede disolverse o suspenderse en solución, 15 “unión” puede definirse como una asociación del compuesto de unión con un objetivo en donde la asociación resulta en la reducción en el movimiento Browniano normal del compuesto de unión.

“Composición de unión” se refiere a un compuesto de unión en combinación con la al menos otra sustancia, como un estabilizador, 20 excipiente, sal, solución reguladora de pH, solvente o aditivo. “Anticuerpo biespecífico” quiere decir un anticuerpo que tiene dos sitios de unión antígeno que tienen especificidades para dos epítopos diferentes, que pueden ser en el mismo antígeno o en dos antígenos diferentes. Anticuerpo biespecíficos

118

incluyen fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Ver por ejemplo Hollinger, *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 64444-48, Gruber, *et al.*, *J. Immunol* 152:5368 (1994).

“Consiste esencialmente en” y variaciones como “consisten
5 esencialmente en” o “consistiendo esencialmente en” como se utiliza a lo largo de la especificación y reivindicaciones indican la inclusión de cualesquiera elementos citados o grupos de elementos y la inclusión opcional de otros elementos de naturaleza similar o diferente que los elementos citados, los cuales no cambian materialmente las propiedades básicas o
10 novedosas del régimen de dosificación, método o composición especificados. Como ejemplo no restrictivo, una citosina o una cadena de anticuerpos que consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos citada también puede incluir una o más secuencias de aminoácido que no afecta materialmente las propiedades de la citosina o de la cadena de anticuerpos.

15 “Reumatismo inflamatorio” quiere decir cualquier enfermedad o condición en la cual (a) la inflamación está presente en cualquier articulación y (b) la inflamación es parte de una respuesta inmune que requiere o es promovida por IL-17. Ejemplos no restrictivos de reumatismos inflamatorios incluyen espondilitis anquilosante, artritis psoriática, artritis reumatoide.

20 “Respuesta inflamatoria” a un fármaco antirreumático significa una reducción en las señales y síntomas de inflamación, como se mide utilizando cualquier estándar acertado conociendo la técnica para el reumatismo inflamatorio de interés. Por ejemplo, comparar el número de

119

articulaciones hinchadas o sensibles entre líneas basales y varios puntos en el tiempo durante el tratamiento es una manera típica de evaluar el estado y respuesta de una articulación. En el conteo de articulaciones del colegio estadounidense de reumatología (ACR) para RA (Felson *et al.* (1995) *Arthritis & Rheumatology* 38; 727-735), se evalúan 68 articulaciones en cuanto a sensibilidad y 66 en cuanto a hinchazón (la cadera no se evalúa en cuanto a hinchazón). En la puntuación de actividad de enfermedades (DAS) empleada principalmente en Europa, se utiliza un conteo de articulaciones ya sea de 44 o 28 en RA. En PsA, los ensayos más recientes de fármacos antirreumáticos han utilizado un conteo de 78 articulaciones sensibles y 66 hinchadas para adaptarse a la frecuencia involucrada en articulaciones distales interfalángicas y de carpos y metacarpos. Además del conteo de articulaciones, los criterios de evaluación de ACR incluyen los siguientes elementos para comprender una puntuación compuesta: global de paciente (en una escala análoga visual [VAS]), dolor de paciente, global de médicos, cuestionario de evaluación de salud (HAQ; una medición de función), y un reactivo de fase aguda (una proteína C-reactiva o índice de sedimentación). Una respuesta ACR 20 constituiría una mejora de 20% en el conteo de articulaciones sensibles e hinchadas y una mejora de 20% de al menos 3 de los otros 5 elementos en los criterios compuestos. Las respuestas 50 y 70 de ACR 50 representan al menos una mejora de 50% y 70% de estos elementos. El sistema ACR sólo representa cambio, mientras que el sistema DAS representa el estado actual de la actividad de la actividad y su cambio. El sistema de puntuación DAS

120

utiliza una fórmula matemática ponderada, derivada de ensayos clínicos en RA. Por ejemplo DAS 28 es $0.56 (\sqrt{T28}) + 0.28 (\sqrt{SW28}) + 0.70 (\ln ESR) + 0.014GH$ en donde T representa el número de articulación sensible, SW es el número de articulación hinchada, ESR es el índice de sedimentación de eritrocitos y GH es salud global. Varios valores de DAS

5 representan una actividad mayor o menor de la enfermedad así como remisión, y el cambio y puntuación de punto final resultan en una categorización del paciente por grado de respuesta (ninguna, moderada, buena).

10 "Paciente inflamatorio que responde" a un fármaco antirreumático quiere decir un sujeto quién, después de 3 meses de tratamiento con el fármaco, tiene una mejora de al menos >20% sobre la línea basal (por ejemplo pretratamiento) en el conteo de articulaciones sensibles ACR y al menos una mejora de >20% sobre la línea basal en el conteo de

15 articulaciones hinchadas ACR.

"Paciente inflamatorio que responde adecuadamente" quiere decir un sujeto que tiene al menos una mejora de 70% sobre la línea basal en cada uno de los conteos de articulaciones sensibles e hinchadas ACR después de 3 meses de tratamiento con el fármaco.

20 "Paciente inflamatorio que responde de manera moderada" quiere decir un sujeto que tiene al menos una mejora de 50% sobre la línea basal en cada uno de los conteos de articulaciones sensibles e hinchadas ACR después de 3 meses de tratamiento con el fármaco.

“Paciente inflamatorio que no responde” a un fármaco antirreumático quiere decir un sujeto quién, después de 3 meses de tratamiento con el fármaco, tiene ya sea una mejora de $\leq 20\%$ sobre la línea basal en conteo de articulaciones sensibles ACR o $\leq 20\%$ de mejora sobre la línea basal en conteo de articulaciones hinchadas ACR, o quien no logra
5 completar el tratamiento con el fármaco antirreumático por 3 meses debido a efectos adversos intolerables o empeoramiento de los síntomas.

“Interleucina-12R beta1” o “IL12RB1” quiere decir una cadena de polipéptidos individual que consiste esencialmente en la secuencia de
10 IL12RB1 humano como se describe en los números de acceso de la base de datos de secuencia de proteínas de NCBI NP714912, NP005526 o variantes que se presentan en la naturaleza de los mismos.

“Interleucina-17” o “IL-17” o “IL-17A” quiere decir una proteína que consiste en una o dos cadenas de polipéptido, con cada cadena
15 consistiendo esencialmente en (1) la secuencia de IL17A humano como se describe en cualquiera de los números de acceso a la base de datos de secuencia de proteínas de NCBI NP002181, AAH67505, AAH67503, AAH67504, AAH66251, AAH66252, o (2) variantes que se presentan en la naturaleza de estas secuencias, incluyendo la forma madura de la cadena de
20 polipéptidos, es decir que no cuenta con el péptido de señal o (3) la secuencia de un IL-17A no humano que incluye IL-17A de ratones o IL-17A de ratas.

“IL-17R” o IL-17RA” quiere decir una cadena de polipéptidos individual que consiste esencialmente en la secuencia de IL-17RA humano

122

como se describe en WO 96/29408 o en cualquiera de los números de acceso de la base de datos de secuencia de proteína de NCBI NP 055154, Q96F46, CAJ86450, o variantes que se presentan en la naturaleza de estas secuencias, incluyendo la forma madura de la cadena de polipéptido, es decir

5 que no tiene el péptido de señal.

“IL-17RC” quiere decir una cadena de polipéptido individual que consiste esencialmente en la secuencia de IL-17C humano como se describe en WO 238764A2 o en cualquier número de acceso de la base de datos de secuencia de proteína de NCBI NP703191, NP703190 y NP116121, o

10 variantes que se presentan en la naturaleza de estas secuencias, incluyendo la forma madura de la cadena de polipéptidos, es decir que no cuenta con el péptido de señal.

“Interleucina-23 (o “IL-23) quiere decir una proteína que consiste en dos cadenas de polipéptido. Una cadena consiste esencialmente en la

15 secuencia de IL23, humano subunidad p19 (también conocida como IL23A) como se describe en cualquiera de los números de acceso de la base de datos de secuencia de proteína de NCBI NP057668, AAH67511, AAH66267, AAH66268, AAH66269, AAH667512, AAH67513 o variantes que se presentan en la naturaleza de estas secuencias, incluyendo la forma madura de la

20 cadena de polipéptido, es decir que no tiene el péptido de señal. La otra cadena consiste esencialmente en la secuencia de IL12 humano, subunidad p40 (también conocida como IL12B e IL23, subunidad p40) como se describe en cualquiera de los números de acceso a la base de datos de secuencia de

proteínas de NCBI NP002178, P29460, AAG32620, AAH74723, AAH67502, AAH67499, AAH67498, AAH67501 o variantes que se presentan en la naturaleza de estas secuencias, incluyendo la forma madura de la cadena de polipéptido, es decir que no tiene el péptido de señal.

- 5 “Interleucina-23R” ó “IL-23R” quiere decir una cadena de polipéptido individual que consiste esencialmente en la secuencia de IL23R de humano como se describe en el número de acceso de la base de datos de secuencia de proteínas de NCBI NP653302 o variantes que se presentan en la naturaleza de los mismos, incluyendo la forma madura de la cadena de polipéptido, es decir que no cuenta con el péptido de señal.

“Articulación” quiere decir el área en donde dos huesos se unen con el propósito de movimiento de partes del cuerpo. Una articulación usualmente se forma de tejido conectivo fibroso y cartílago. Una articulación o una artrosis es lo mismo que una articulación.

- 15 “Anticuerpo monoclonal” o “mAb” quiere decir un anticuerpo obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular.

- 20 “Escala normal” en el contexto de niveles de biomarcador séricos se refiere a la escala de niveles séricos del biomarcador encontrados en una población de sujetos saludables, coincidentes en genero y edad. El tamaño mínimo de esta población sana puede determinarse utilizando mediciones estadísticas estándares, por ejemplo el medico tratante podría

tomar en cuenta la incidencia de la enfermedad de la población general y el nivel de certidumbre estadística que se ve en los resultados. Preferiblemente, la escala de mapa a niveles séricos de un biomarcador de destrucción de articulaciones se determina a partir de una población de al menos 5, 10 o 20 sujetos, más preferiblemente a partir de una población de al menos 40 u 80 sujetos, incluso más preferiblemente de más de 100 sujetos.

“Normaliza” o “normalización” en el contexto de niveles de biomarcadores séricos se refiere a un cambio al alza o a la baja en el nivel sérico de un biomarcador después del tratamiento con un antagonista de IL-17A tal que el nivel sérico cambiado esta más cercano a escala normal parece biomarcador o caer preferiblemente dentro de la escala normal. Los niveles de algunos marcadores séricos de metabolismo óseo y de cartílago o destrucción aumentan en sujetos artríticos (por ejemplo COMP y RANKL); así para tales marcadores una normalización quiere decir que al nivel sérico disminuye después del tratamiento con un antagonista de IL-17A, comparado con el nivel sérico previo al tratamiento. No obstante, otros marcadores séricos de metabolismo óseo y de cartílago o su destrucción disminuye en sujetos artríticos (por ejemplo osteocalcinas); así para tales marcadores una normalización quiere decir que el nivel sérico aumenta después del tratamiento con un antagonista de IL-17A, comparado con el nivel sérico previo a dicho tratamiento.

“Administración parenteral” quiere decir una inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular.

15

“Molécula pequeña” quiere decir una molécula con peso molecular que sea menor a 10 KD, típicamente menor a 2kD y preferiblemente menor a 1 kD. Moléculas pequeñas incluyen, sin restricción, moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas, moléculas orgánicas que contienen un componente inorgánico, moléculas que comprenden un átomo radioactivo, moléculas sintéticas, miméticos de péptidos y miméticos de anticuerpos. Miméticos de péptidos de anticuerpo y citosinas se conocen en la técnica. Ver 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 los Estados Unidos No. 6,326,482 otorgada a Stewart, et al.

“Artritis psoriática” o “PsA” es una enfermedad crónica caracterizada por la inflamación de la piel (psoriasis) y articulaciones (artritis). La psoriasis está caracterizada por áreas rojas irregulares y elevadas de inflamación de la piel con descamación y frecuentemente afecta las puntas de los codos y rodillas, el cuero cabelludo, el ombligo y alrededor de las áreas genitales o ano. Aproximadamente 10% de los pacientes que tienen psoriasis también desarrollan una inflamación asociada de sus articulaciones. Los pacientes que tienen artritis inflamatoria y psoriasis se les diagnostica como con artritis psoriática. La artritis psoriática es una enfermedad reumática

26

sistémica que también puede ocasionar la inflamación en tejidos corporales lejos de las articulaciones y la piel, como en los ojos, corazón, pulmones y riñones.

“Suero” quiere decir suero sanguíneo o plasma sanguíneo.

- 5 “Sujeto” quiere decir cualquier animal. En algunas modalidades preferidas, será fácilmente evidente a un experto en la técnica a partir del contexto que el sujeto es un animal de investigación común roedor, incluyendo ratones o ratas con o sin artritis inducida experimentalmente. En estas modalidades preferidas, será fácilmente evidente al experto en la
- 10 técnica que el sujeto es un humano.

- “Trata” o “tratando” quiere decir administrar un agente terapéutico, como una composición que contiene cualquiera de los antagonistas de IL-17A descritos aquí, internamente o externamente un paciente que necesita el agente terapéutico. Típicamente, el agente se administra en una cantidad
- 15 efectiva para prevenir o aliviar una o más síntomas de la enfermedad, o uno o más efectos adversos de tratamiento con un agente terapéutico diferente, ya sea prevenir el desarrollo de, inducir la regresión de o inhibir el avance de tal síntoma o efecto adverso en cualquier grado clínicamente medible. La cantidad de un agente terapéutico que sea efectivo para aliviar cualquier
- 20 síntoma de enfermedad en particular o efecto adverso (también conocido como la “cantidad terapéuticamente efectiva”) pueden variar de acuerdo con los factores como el estado de la enfermedad, edad y peso del paciente y la capacidad del agente terapéutico para generar una respuesta deseada en el

paciente. Ya sea que un síntoma de la enfermedad o efecto secundario se haya aliviado, puede valorarse por medio de cualquier medición clínica generalmente utilizada por los médicos u otros profesionales de la salud para valorar la gravedad o el estado de avance de ese síntoma o efecto

5 secundario. Cuando se administra un agente terapéutico a un paciente que tiene una enfermedad activa, una cantidad terapéuticamente eficaz generalmente dará como resultado una reducción del síntoma medido por al menos 5%, comúnmente por al menos 10%, más comúnmente al menos 20%, más comúnmente al menos 30%, preferiblemente al menos 40%, más

10 preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, de manera ideal al menos 70%, de manera más ideal al menos 80% e inmejorablemente al menos 90%. Ya que una modalidad de la presente invención (por ejemplo, un método de tratamiento o producto fármaco) no puede ser eficaz en la prevención o alivio del (de los) síntoma(s) o efecto(s)

15 secundario(s) de la enfermedad objetivo, debe aliviar tal(es) síntoma(s) o efecto(s) secundario(s) en un número estadísticamente significativo de pacientes como lo determina cualquier prueba estadística conocida en la técnica tal como la prueba T de Student, la prueba de chi al cuadrado, la prueba U de acuerdo con Mann y Whitney, la prueba de Kruskal-Wallis

20 (prueba H), la prueba de Jonckheere-Terpstra y la prueba de Wilcoxon.

128

II. General

Como se describe más detalladamente a continuación en los ejemplos, la presente invención está basada en los descubrimientos sobre la terapia anti-IL-17A en un modelo de ratón de RA (1) que inhibe la erosión ósea, incluso cuando la terapia anti-IL-17A no tuvo un efecto evidente en la inflamación y (2) que disminuye los niveles de suero de varios marcadores del metabolismo de cartílagos y/o huesos. Estos descubrimientos tienen las siguientes repercusiones para la terapia anti -IL-17A de reumatismo inflamatorio:

- 10 • los pacientes cuyos signos externos de enfermedad (por ejemplo, media de articulaciones inflamadas y sensibles, IL-6 en suero, suero CRP, reactantes de fase aguda, HAQ, evaluadores globales del paciente y médico, sistema compuesto de calificación ACR20/50/70) no son adecuadamente controlados por otros fármacos antirreumáticos pueden derivar en la
- 15 protección de las articulaciones beneficiándose de IL-17A bloqueador con la protección de las articulaciones;
- los pacientes tratados con un antagonista de IL-17A que derivan en poco o ningún beneficio al valorarse por estos signos externos de enfermedad, todavía pueden lograr una inhibición de la destrucción de las
- 20 articulaciones tal como lo valoran los rayos X (media de erosión ósea) o MRI (medida de inflamación sinovial);
- los pacientes que tienen niveles de suero de marcadores de enfermedad que sugieren pronósticamente el potencial para la destrucción

acelerada de articulaciones (por ejemplo, niveles de suero elevados de COMP, CTX-II, CTX-I, RANKL, OPG, TRACP, YKL-40, u otros marcadores de destrucción de cartílago y/o hueso, o niveles de suero reducidos de osteocalcina) pueden experimentar el mayor beneficio de conservación de articulaciones de la terapia anti-IL-17A, a pesar de si tal terapia modula los signos externos de la enfermedad; y

- modulación a corto plazo de niveles elevados de marcadores de suero de destrucción de hueso y cartílago (por ejemplo, COMP, CTX-1, CTX-II, HC gp-39, OPG y RANKL) o marcadores de suero reducidos de destrucción ósea (por ejemplo, osteocalcina) pueden utilizarse para valorar si el bloqueo de IL-17A sostiene la promesa a largo plazo como una terapia protectora de articulaciones, es decir, como marcadores farmacodinámicos o marcadores alternativos para rayos X con base en las mediciones de eficacia. Por lo tanto, la presente invención provee métodos, kits y productos de fármacos que están dirigidos al uso de biomarcadores de destrucción de articulaciones para guiar la terapia con antagonistas de IL-17A.

La medición del nivel de suero de un biomarcador de destrucción de articulaciones en la presente invención puede lograrse utilizando cualquier técnica conocida en la técnica antecedente. Los ensayos para COMP, CTX-1, CTX-II, HC gp-39, OPG y RANKL están disponibles comercialmente y descritos en el documento.

Ensayos COMP: AnaMar Medical, Lund, Sweden (Crnkic, M., et al., Arth. Res. Ther. 2003; 5:R181-R185); AnaMar Medical, Lund, Sweden

(Mundermann, A., et al., Osteo and Cartilage 2005; 13:34-38); AnaMar Medical, Lund, Sweden (Skoumal, M., et al., Arth. Res. Ther. 2004; 6:73-74); AnaMar Medical, Lund, Sweden (Skoumal Scand J. Rheum. 2003); AnaMar Medical, Lund, Sweden (Lindqvist, E., et al., Ann. Rheum. Dis 2005; 64:196-201); Lab Inhibition ELISA (Wisłowska, Clin. Rheumatol 2005; 24:278-284); Lab ELISA (Mansson, J. Clin. Invest. 1995); Lab ELISA (Senolt Physiological Res. 2007); Ana Mar Medical, Lund, Sweden (Morozzi, G., et al., Clin Rheum 2007); AnaMar Medical, Lund, Sweden (Andersson, M.L.E., et al., Ann Rheum Dis 2006; 65:1490-1494).

10 Ensayos de HC gp39: Quidel, US (Hetland, ACR2006); Lab assay (den Broeder, A.A., et al., Ann Rheum Dis 2002; 61:311-318); Lab RIA assay (Johansen, J.S., et al., Rheumatology 1999; 38:618-626).

 Ensayos RANKL: ELISA interno de AMGEN (Geusens, P.P., et al., Arth Rheum 2006; 54(6):1772-1777); ELISA (Immun-diagnostik, Germany, Vis Ard.bmjjournals.com 2006).

 Ensayos OPG: Biomedica Medizinprodukte, Vienna, Austria (Geusens, Arth Rheum 2006; supra); ELISA (Immundiagnostik, Germany) (Vis Ard.bmjjournals.com 2006); ELISA (Immunodiagnostik, Bensheim, Germany); (Valleala, H., et al., Eur. J. Endocrinology 2003; 148:527-530).

20 Ensayos CTX-I: CrossLaps ELISA (Osteometer Biotech, Herlev, Denmark) (Garnero, P., et al., Arth Rheuma 2002; 46(11):2847-2856); CrossLaps (Rosch , Mannheim, Germany) (Lange, U., et al., Rheumatology 2005; 44:1546-1548).

Ensayos CTX-II: CartiLaps ELISA (Osteometer Biotech, Herlev, Denmark) (Garnero, P., et al., Arth Rheuma 2002; supra); CartiLaps ELISA (Osteometer Biotech, Herlev, Denmark) (Garnero, Arth Rheuma 2002; 46:21-30); PC-Cartilaps (Nordic Biosciences Diagnostics, Herlev, Denmark) (Olsen, 5 A.K., et al., Osteoarth. and Cartilage 2007; 15:335-342).

Los antagonistas útiles en la presente invención inhiben, bloquean o neutralizan la actividad de IL-17A, la cual incluye inhibir la actividad de IL-17A al estimular la acumulación de neutrófilos en un área localizada e inhibir la actividad de IL-17A al estimular la activación de 10 neutrófilos (ver, por ejemplo, Kolls, J. et al. (2004) Immunity Vol. 21, 467-476). IL-17A puede inducir o estimular la producción de cualquiera de las siguientes citocinas pro-inflamatorias y movilizadoras de neutrófilos, dependiendo del tipo de célula: IL-6, MCP-1, CXCL8 (IL-8), CXCL1, CXCL6, TNF α , IL-1 β , G-CSF, GM-CSF, MMP-1 y MMP-13.

15 Los antagonistas de IL-17A antagonistas útiles en la presente invención incluyen un receptor soluble que comprende el dominio extracelular de un receptor funcional para IL-17A. Los receptores solubles pueden prepararse y utilizarse de acuerdo con los métodos estándar (ver, por ejemplo, Jones, et al. (2002) Biochim. Biophys. Acta 1592:251-263; 20 Prudhomme, et al. (2001) Expert Opinion Biol. Ther. 1:359-373; Fernandez-Botran (1999) Crit. Rev. Clin. Lab Sci. 36:165-224).

Los antagonistas de IL-17A preferidos para uso en la presente invención son anticuerpos o anticuerpos biespecíficos que se enlazan

132

especialmente a e inhiben la actividad de cualquiera de IL-17A, IL-17RA, IL-17RC, y un complejo heteromérico que comprende IL-17RA y IL-17RC. Más preferiblemente, el objetivo del antagonista de IL-17A es IL-17A o IL-17RA. Los antagonistas de IL-17A particularmente preferidos se enlazan
5 específicamente a e inhiben la actividad de IL-17A. Un antagonista de IL-17A particularmente preferido es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende un cadena ligera que tiene SEQ ID NO:1 y una cadena pesada que tiene SEQ ID NO:2.

Otro antagonista de IL-17A preferido para uso en la presente
10 invención es un anticuerpo biespecífico o fragmento de anticuerpo biespecífico, el cual también antagoniza la actividad de IL-23. Tales antagonistas biespecíficos se enlazan a e inhiben la actividad de cada miembro en cualquiera de las siguientes combinaciones: IL-17A y IL-23; IL-17A y IL-23p19; IL-17A y IL-12p40; IL-17A y un complejo de IL-23R/IL12RB1;
15 IL-17A y IL-23R; IL-17A y IL12RB1; IL17RA y IL-23; IL-17RA y IL-23p19; IL-17RA y IL-12p40; IL-17RA y un complejo de IL-23R/IL12R; IL-17RA y IL-23R; IL-17RA y IL12RB1; IL17RC y IL-23; IL-17RC y IL-23p19; IL-17RC y IL-12p40; IL-17RC y un complejo de IL-23R/IL12RB1; IL-17RC y IL-23R; IL-17RC y IL12RB1; un complejo de IL-17RA/IL-17RC y IL-23; un complejo de IL-17RA/IL-17RC y IL-23p19; un complejo de IL-17RA/IL-17RC y IL-12p40; un complejo de IL-17RA/IL-17RC y un complejo de IL-23R/IL12RB1; un complejo de IL-17RA/IL-17RC y IL-23R; y un complejo de IL-17RA/IL-17RC y IL12RB1. Las combinaciones preferidas concentradas por anticuerpos
20

13

biespecíficos utilizadas en la presente invención son las siguientes: IL-17A y IL-23; IL-17A y IL-23p19; IL17RA y IL-23; y IL-17RA y IL-23p19. Un anticuerpo biespecífico particularmente preferido se enlaza específicamente a e inhibe la actividad de cada uno de IL-17A y IL-23p19.

- 5 Los antagonistas de IL-23 preferidos son anticuerpos que se enlazan a e inhiben la actividad de 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, el cual consiste esencialmente en el dominio extracelular de IL-23R, por ejemplo, 1-353
- 10 aminoácidos de GenBankAAM44229 o un fragmento del mismo.

- Los antagonistas de anticuerpo para uso en la invención pueden prepararse por medio de cualquier método conocido en la técnica para preparar anticuerpos. La preparación de anticuerpos monoclonales, policlonales y humanizados se describe en Sheperd and Dean (eds.) (2000)
- 15 Monoclonal Antibodies, Oxford Univ. Press, New York, NY; Kontermann and Dubel (eds.) (2001) Antibody Engineering, Springer-Verlag, New York; Harlow and 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
- 20 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 and Winter (1992) J. Mol. Biol. 224:487-499; y E.U.A. Pat. No. 6,329,511 emitida a Vasquez, et al.

B4

Cualquier forma antigénica del objetivo deseado puede utilizarse para generar anticuerpos, los cuales pueden analizarse para aquellos que tienen la actividad antagonista deseada. Por lo tanto, el antígeno obtenido puede ser un péptido que contiene un solo epítipo o múltiples epítipos, o puede ser la proteína completa sola o en combinación con uno o más agentes estimuladores de la capacidad inmunógena conocida en la técnica. Para mejorar la capacidad inmunógena de un péptido antigénico, el péptido puede conjugarse a una proteína portadora. El antígeno también puede ser una proteína aislada de longitud completa, una proteína de superficie celular (por ejemplo, inmunizar sólo con células transfectadas con al menos una porción del antígeno), o una proteína soluble (por ejemplo, inmunizar sólo con la porción de dominio extracelular de la proteína). El antígeno puede expresarse por medio de una célula modificada genéticamente, en donde el ADN que codifica el antígeno es genómico o no genómico (por ejemplo, en un plásmido).

Un péptido que consiste esencialmente en una región de alta antigenicidad predicha puede utilizarse para una generación de anticuerpos. Por ejemplo, las regiones de alta antigenicidad de p19 humano ocurren en los aminoácidos 16-28; 57-87; 110-114; 136-154; y 182-186 de GenBank AAQ89442 (gi:37183284) y las regiones de alta antigenicidad de IL-23R humano ocurren 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

235

odeGenBank AAM44229 (gi: 21239252), como lo determina el análisis con un gráfico Parker que utiliza Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD).

Puede utilizarse cualquier método adecuado de inmunización. Tales métodos pueden incluir el uso de adyuvantes, otros
5 immunoestimulantes, refuerzos de vacunas y el uso de una o más vías de inmunización. La inmunización también puede realizarse por medio de una inmunización del vector de ADN, ver, por ejemplo, Wang, et.al. (1997) Virology 228:278-284. Alternativamente, los animales pueden vacunarse con células que portan el antígeno de interés, el cual puede proveer la generación
10 superior de anticuerpos con el antígeno purificado (Kaithamana, et al. (1999) J. Immunol. 163:5157-5164).

Los antagonistas de anticuerpos preferidos son anticuerpos monoclonales, los cuales pueden obtener por medio de una variedad de técnicas que los expertos en la técnica conocen. Los métodos para generar
15 anticuerpos monoclonales se describen generalmente en Sites, et al. (eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (4th ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, y las referencias aquí mencionadas; Harlow and Lane (1988) ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL CSH Press; Goding (1986) MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2d ed.) Academic Press, New York,
20 NY. Generalmente, los esplenocitos aislados de un huésped mamífero vacunado están inmortalizados, comúnmente por fusión con una célula de mieloma para producir un hibridoma. See Kohler and 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 virus de Epstein-Barr, oncogenes o retrovirus u otros métodos conocidos en la técnica. See, e.g., Doyle, et al. (eds. 1994 and periodic supplements)

- 5 CELL AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES, John Wiley and Sons, New York, NY. Las colonias que surgen células immortalizadas una vez se analizan para la producción de anticuerpos de la actividad de especificidad, afinidad e inhibidora utilizando ensayos de enlace y biológicos adecuados. Por ejemplo, el anticuerpo para concentrar las propiedades de enlace puede
- 10 medirse, por ejemplo, por medio de la resonancia de plasmón superficial (Karlsson, et. al. (1991) *J. Immunol. Métodos* 145:229-240; Neri, et al. (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:1271-1275; Jonsson et al. (1991) *Biotechniques* 11:620-627) or by competition ELISA (Friguet, et al. (1985) *J. Immunol. Methods* 77:305-319; Hubble (1997) *Immunol. Today* 18:305-306).

- 15 Alternativamente, cualquiera podría aislar las secuencias de ADN que codifican un anticuerpo monoclonal o un fragmento de enlace del mismo al analizar una genoteca de ADN de células B humanas, ver, por ejemplo, Huse, et. al. (1989) *Science* 246:1275-1281. Otras técnicas adecuadas abarcan analizar la genoteca de expresión en anticuerpo de fago.
- 20 See, e.g., 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.

137

Los anticuerpos monoclonales preferidos para uso en la presente invención son anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los cuales el dominio variable es de un anticuerpo parental generado en un animal mamífero experimental, tal como una rata o un ratón y los dominios

5 constantes se obtienen de un anticuerpo humano para que sea menos probable que el anticuerpo quimérico resultante provoque una respuesta inmunológica adversa en un sujeto humano que en el anticuerpo mamífero parental. Más preferiblemente, un anticuerpo monoclonal utilizado en la presente invención es un "anticuerpo humanizado", en el que todas o

10 sustancialmente todas las aspas hipervariables (por ejemplo, las regiones que determinan la complementariedad o CDR) en los dominios variables corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de marco de trabajo (FR, por sus siglas en inglés) en los dominios variables son aquellas de una secuencia de

15 inmunoglobulina humana. Un anticuerpo monoclonal particularmente preferido para uso en la presente invención es un "anticuerpo completamente humano", por ejemplo, un anticuerpo que comprende únicamente secuencias de proteína de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo completamente humano puede contener cadenas de carbohidrato de las especies celulares

20 en las cuales 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 completamente humano generalmente contendrá cadenas de carbohidrato de murina.

Los anticuerpos monoclonales utilizados en la presente invención también pueden incluir anticuerpos camélidos de un solo dominio. See, e.g., Muyldermans et al. (2001) Trends Biochem. Sci. 26:230; Reichmann et al. (1999) J. Immunol. Methods 231:25; WO 94/04678; WO 5 94/25591; U.S. Pat. No. 6,005,079.

Los anticuerpos antagonistas utilizados en la presente invención pueden haber modificado (o bloqueado) las regiones Fc para proveer funciones efectoras alteradas. Ver, por ejemplo la patente de E.U.A. No. 5,624,821; WO2003/086310; WO2005/120571; WO2006/0057702. Las 10 alteraciones de la región FC incluyen cambios de aminoácidos (sustituciones, delecciones e inserciones) glicosilación o desglicosilación y agregar múltiples Fc. Los cambios al Fc pueden alterar la vida media de los anticuerpos terapéuticos, haciendo posible una dosis menos frecuente y así una facilidad aumentada y uso disminuido de material. See Presta (2005) J. Allergy Clin. 15 Immunol. 116:731 at 734-35.

Los anticuerpos también pueden conjugarse (por ejemplo, enlazados covalentemente) a las moléculas que mejoran la estabilidad del anticuerpo durante el almacenamiento o aumentar la vida media del anticuerpo in vivo. Los ejemplos de las moléculas que aumentan la vida 20 media son albúmina (por ejemplo, albúmina en suero humano) y polietilenglicol (PEG). Los derivados enlazados con albúmina y PEGilados de los anticuerpos pueden prepararse utilizando técnicas conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Chapman, A.P. (2002) Adv. Drug Deliv. Rev. 54:531-545;

B9

Anderson and Tomasi (1988) J. Immunol. Methods 109:37-42; Suzuki, et al. (1984) Biochim. Biophys. Acta 788:248-255; y Brekke and Sandlie (2003) Nature Rev. 2:52-62).

Los anticuerpos biespecíficos que antagonizan tanto la actividad
5 de IL-17 como IL-23 pueden producirse por medio de cualquier técnica conocida en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden producirse de manera recombinante utilizando la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina. See, e.g., Milstein et al. (1983) Nature 305: 537-39. Alternativamente, los anticuerpos biespecíficos
10 pueden prepararse utilizando el enlace químico. See, e.g., Brennan, et al. (1985) Science 229: 81. Estos anticuerpos biespecíficos también pueden prepararse por medio de un intercambio de disulfuro, la producción de hibridomas híbridos (quadromas) por transcripción y traslación para producir una cadena de un solo polipéptido que pueda asociarse covalentemente para
15 producir un anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico contemplado también puede hacerse completamente por 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.

20 Los anticuerpos utilizados en la presente invención generalmente se unirá'n con al menos un K_D de aproximadamente 10^{-3} M, más generalmente al menos 10^{-6} M, comúnmente al menos 10^{-7} M, más comúnmente al menos 10^{-8} M, de preferencia al menos alrededor de 10^{-9} M, y

140

con más preferencia al menos 10^{-10} M, y con mayor preferencia al menos 10^{-11} M (ver, 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. (Suppl.)* 9:3982s-3990s).

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

141

La vía de administración dependerá de las propiedades del antagonista u otro agente terapéutico utilizado en la composición farmacéutica. De preferencia, las composiciones farmacéuticas que contienen los antagonistas de IL-17A y los antagonistas de IL-23 se administran sistémicamente por ingestión oral, inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intracerebroespinal, intralesional, o pulmonar, o por sistemas de liberación sostenida tales como implantes. También se ha descrito la inyección de vectores de transferencia genética en el sistema nervioso central (ver 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; U.S. Pat. Nos. 6,350,466 and 6,316,024).

Las composiciones farmacéuticas utilizadas en la invención pueden administrarse de acuerdo con cualquier régimen de tratamiento que mejore o prevenga la destrucción de articulaciones. Seleccionar el régimen de tratamiento dependerá de varios factores que dependen de la composición y que dependen del paciente, incluyendo, pero no limitando la vida media del antagonista, la gravedad de los síntomas del paciente y el tipo o duración de cualquier efecto secundario. Preferiblemente, el régimen de administración aumenta la cantidad del agente terapéutico suministrado al paciente que concuerda con un nivel aceptable de efectos secundarios. Se encuentra

142

disponible la orientación all seleccionar las dosis adecuadas de anticuerpos terapéuticos y las moléculas pequeñas (ver por ejemplo, Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New 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 tales como los anticuerpos pueden proporcionarse por infusión continua o por dosis en intervalos de, por ejemplo, una vez al día, una vez a la semana o 2 a 7 veces a la semana, una vez una semana sí y otra no, o una vez al mes. Una dosis semanal total para un anticuerpo generalmente es al menos 0.05 µg/kg en peso corporal, más generalmente al menos 0.2 µg/kg, más generalmente al menos 0.5 µg/kg, comúnmente al menos 1 µg/kg, más comúnmente al menos 10 µg/kg, más comúnmente al menos 100 µg/kg, preferiblemente al menos 0.2 mg/kg, más preferiblemente al menos 1.0 mg/kg, más preferiblemente al menos 2.0 mg/kg, de manera óptima al menos 10 mg/kg, de manera óptima al menos 25 mg/kg, y de manera óptima al menos 50 mg/kg (ver por ejemplo, Yang, et al. (2003) New Engl. J. Med. 349:427-434; Herold, et al. (2002) New Engl. J.

143

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 imitador de péptido, producto natural o químico orgánico, es aproximadamente la misma para un anticuerpo o polipéptido en una base de moles/kg. La determinación de una dosis adecuada la realiza un médico, por ejemplo, utilizando parámetros o factores conocidos o posibles en la técnica para influir en el tratamiento o que se cree puede influir en el tratamiento. Generalmente, la dosis de inicio es una cantidad de alguna manera menor a la dosis óptima y la dosis se aumenta por medio de pequeños aumentos en lo sucesivo hasta lograr el efecto deseado u óptimo con relación a cualquier efecto secundario negativo.

En una modalidad preferida, el antagonista de IL-17A es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende una cadena ligera que tiene la SEQ ID NO:1 y una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO:2. Este Mab humanizado se administra preferiblemente de manera subcutánea dos veces a la semana, semanalmente, cada dos semanas o mensualmente en una dosis entre 10 mg y 2,000 mg, más preferiblemente una o dos veces al mes entre 20 mg y 400 mg, e incluso más preferiblemente una vez al mes en una dosis de entre 40 mg y 100 mg. En una modalidad preferida, este Mab humanizado se administra de acuerdo con un régimen de dosis que alcanza concentraciones séricas de 0.1-100 µg/mL, o más preferiblemente 1-10 µg/mL.

Los regímenes de tratamiento que utilizan antagonistas de IL-17A generalmente los determinará el médico tratante y tomará en cuenta la edad, antecedentes médicos, síntomas de enfermedad y tolerancia a diferentes tipos de medicamentos y regímenes de dosis del paciente.

- 5 Generalmente, el régimen de tratamiento está diseñado para suprimir el sistema inmunológico demasiado agresivo dejando que el cuerpo finalmente se re-regule con el resultado de que por lo general después de que el paciente ha esta tomando medicamentos sistémicos para suprimir la respuesta inmunológica inadecuada por un tiempo limitado (por ejemplo, un
- 10 año), el medicamento entonces puede reducirse e interrumpirse sin recidivas del ataque auto-inmunológico. Algunas veces, sucede la reactivación del ataque, en cuyo caso el paciente debe ser re-tratado.

- Por lo tanto, en algunos casos, el médico puede prescribir al paciente un cierto número de dosis del antagonista de IL-17A por un periodo
- 15 de tiempo, después de lo cual se suspende la terapia con el antagonista. Preferiblemente, después de un periodo de tratamiento inicial en el que uno o más síntomas agudos de esta enfermedad desaparecen, el médico continuará la terapia con antagonistas por cierto tiempo en el cual la cantidad y/o frecuencia del antagonista administrado se reduce gradualmente antes de
- 20 que se interrumpa el tratamiento.

La presente invención también contempla los regímenes de tratamiento en los cuales se utiliza un antagonista de IL-17A en combinación con un antagonista de IL-23. Tales regímenes pueden ser especialmente

útiles en el tratamiento de la fase aguda del reumatismo inflamatorio, en el cual el antagonista de IL-17A inhibe la actividad de las células Th₁₇ existentes, mientras que el antagonista de IL-23 previene la generación de nuevas células Th₁₇. Tal terapia de combinación puede proveer tratamiento eficaz

5 utilizando una dosis más baja del antagonista de IL-17A y/o administrar el antagonista de IL-17A por un tiempo más corto. Ya que los síntomas mejoran, la terapia con el antagonista de IL-17A preferiblemente se interrumpe, mientras que la administración del antagonista de IL-23 sigue previniendo la generación de nuevas células Th₁₇ autorreactivas que llevan a

10 la recidiva de la enfermedad. Los dos antagonistas pueden administrarse al mismo tiempo en una sola composición o en composiciones separadas. Alternativamente, los dos antagonistas pueden administrarse en intervalos separados. También pueden utilizarse diferentes dosis de antagonistas. De manera similar, un anticuerpo biespecífico anti IL-17A/IL-23 también puede

15 administrarse durante la fase aguda y retirarlo gradualmente después del tratamiento con anticuerpo anti-IL-23 para mantener la represión de la enfermedad.

El régimen de tratamiento también puede incluir el uso de otros fármacos antirreumáticos u otros agentes terapéuticos para mejorar uno o

20 más síntomas del reumatismo inflamatorio o para prevenir o mejorar los efectos secundarios de la terapia con antagonistas. Los ejemplos de agentes terapéuticos que se han utilizado para tratar los síntomas del reumatismo inflamatorio son NSAID y DMARD.

146

En cualquiera de las terapias aquí descritas en las cuales se utilizan dos o más sustancias terapéuticas diferentes (por ejemplo, un antagonista de IL-17A y un antagonista de IL-23 o un antagonista de IL-17A y un fármaco antirreumático diferente), se entenderá que las sustancias terapéuticas diferentes se administran en conjunto, es decir, se pueden administrar al mismo tiempo en la misma composición farmacéutica o como composiciones separadas o las sustancias pueden administrarse en tiempos separados y en diferente orden.

La eficacia de la terapia antagonista de IL-17A para inhibir la destrucción de articulaciones en un paciente en particular puede determinarse utilizando las medidas de diagnóstico tales como reducción u aparición de los síntomas inflamatorios (por ejemplo, media de articulaciones inflamadas), valoración del dolor del paciente; valoración del paciente y el evaluador de la actividad global de la enfermedad y otras manifestaciones subyacentes de la patología de articulaciones. Las mediciones de diagnóstico de un sujeto que va a ser tratado o que es tratado de acuerdo con la invención pueden compararse con los datos obtenidos de un sujeto control o muestra control, que puede proveerse como un valor predeterminado, por ejemplo adquirido de un grupo estadísticamente adecuado de sujetos control.

147

EJEMPLO 1**Ensayo para anticuerpos anti-IL-17A**

- La capacidad de los anticuerpos anti-IL-17A útil en la presente
- 5 invención para bloquear la actividad biológica de IL-17A se mide al monitorear la expresión de IL-6 inducida por rhIL-17A en una línea celular primaria de fibroblasto dérmico humano (adult) normal (NHDF). En resumen, varias concentraciones de un anticuerpo anti-IL-17A que se va a analizar se incuban con rhIL-17A y la mezcla resultante se agrega a los cultivos de células NHDF.
- 10 La producción de IL-6 production se determina de ahí en adelante como una medida de la capacidad del anticuerpo en cuestión para inhibir la actividad de IL-17A. A continuación se detalla un protocolo.

- Se prepara una serie de diluciones dobles de anticuerpos anti-IL-17A a (en duplicado) empezando con una solución madre a 40 µg/ml. Se
- 15 prepara una solución madre de rhIL-17A a 120 ng/ml. Setenta µl de la solución madre rhIL-17A se mezclan con 70 µl de las diluciones del anticuerpo anti-IL-17A en pozos de una placa de microtitulación y se incuban a temperatura ambiente por 20 minutos. Cien µl de cada una de estas mezclas se agrega después a los pozos de una placa de microtitulación que
- 20 se ha cultivado con 1×10^4 NHDF células/pozo (100 µl) la noche anterior y se dejan incubar a 37°C. Las células NHDF (conducto 4) se obtuvieron de Cambrex BioScience (Baltimore, Maryland, E.U.A.). La concentración resultante final de rhIL-17A es 30 ng/ml (1 nM), y la escala de anticuerpos

148

hacia abajo en intervalos de 10 µg/ml. Se incubaron las placas a 37°C por 24 horas, después de cosechar el sobrenadante y remover 50 µl para uso en un IL-6 ELISA.

El ELISA para la detección de IL-6 humano se realiza de la siguiente manera. Los reactivos generalmente son de R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, E.U.A.). Un anticuerpo de captura de hIL-6 (50 µl/pozo de una solución de 4 µg/ml) se transfiere a los pozos de una placa de microtitulación, la cual está sellada y se incuban por la noche a 4°C. La placa se lava tres veces y después se bloquea con 100 µl/pozo de solución reguladora de bloqueo por 1 hora o más. Después, la placa se lava nuevamente tres veces. Se agregan muestras experimentales (50 µl del sobrenadante de cultivo) y controles (diluciones en serie de la proteína IL-6) a los pozos en 50 µl y se incuban por dos horas. Se lavan las placas tres veces y, se agrega 50 µl/pozo de un anticuerpo de detección de anti-IL-6 biotinilado (300 ng/ml). Se incuban las placas a temperatura ambiente por dos horas, se lavan tres veces y se agrega 100 µl/pozo de estreptavidina HRP y se incuban por 20 minutos. Nuevamente se lava la placa, se agrega ABTS (BioSource, Carlsbad, California, E.U.A.) (100 µl/pozo) y se incuba por 20 minutos. Se agrega una solución quelante (100 µl/pozo) y se mide la absorbancia a 405nm.

El IC50 para un anticuerpo anti-IL-17A es la concentración de anticuerpo requerida para reducir el nivel de producción de IL-6 inducida por

rhIL-17A a 50% del nivel observado en la ausencia de cualquier anticuerpo anti-IL-17A agregado.

EJEMPLO 2

5 Anticuerpos Anti-IL-17A de ensayo de fibroblastos de prepucio

La capacidad de los anticuerpos anti-IL-17A útil en la presente invención para bloquear la actividad biológica de IL-17A se mide al monitorear la expresión de IL-6 inducida por rhIL-17A en una línea celular primaria de
10 fibroblasto de prepucio HS68. La producción reducida de IL-6 en respuesta a rhIL-17A se utiliza como una medida de la actividad de bloqueo por los anticuerpos anti-IL-17A útiles en la presente invención.

El análisis de la expresión de IL-17RC (un receptor de IL-17A) en un panel de líneas celulares de fibroblastos identificó la línea celular de
15 fibroblastos de prepucio humano HS68 (ATCC CRL1635) como una línea celular sensible a IL-17A. Esto se confirmó por la tinción de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo IL-17R anti-humano caprino policlonal (R&D Systems, Gaithersburg, Maryland, E.U.A.) seguido de IgG anti-caprino de burro con ficoeritrina (PE)-F(ab')₂(Jackson Immunoresearch,
20 Inc., West Grove, Pennsylvania, E.U.A.), y al analizar la señal de inmunofluorescencia PE en un citómetros de flujo (FACScan, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, E.U.A.). Como validación adicional del modelo, IL-17A (ambos rhIL-17A derivado de adenovirus y IL-17A

15

derivado de E. coli comercialmente disponible, R&D Systems) provocaron una inducción sensible a la dosis de IL-6 en las células HS68 con un EC50 de 5–10 ng/ml, cuya inducción se bloqueó por pre-incubación con anticuerpos anti-IL-17A policlonales y monoclonales (R&D Systems).

- 5 El ensayo de inhibición de IL-17A se realiza de la siguiente manera. Un matraz confluyente T-75 de células HS68 cells (aproximadamente células 2×10^6) se lavó con PBS de Dulbecco sin Ca^{++} y Mg^{++} y después se incubó con 5 ml del medio de disociación celular (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, E.U.A.) por 2–5 minutos a 37°C en una incubadora a 5% CO_2 .
- 10 Después se cosechan las células con 5 ml de medio de cultivo tisular (TC) y se centrifugan por 5 minutos a 1000 rpm. El medio TC medium es el Medio de Eagle modificado por el de Dulbecco (con glutamina), 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (Hyclone), 10 mM Hepes, 1mM de piruvato de sodio, penicilina, y estreptomicina. Se vuelven a suspender las células en 2 ml de
- 15 medio TC, diluido 1:1 con azul tripano y se contabiliza. Las concentraciones celulares se ajustan a 1×10^5 células/ml en medio TC y 0.1 ml/pozo se reparte en alícuotas en los pozos de una placa de fondo plano que contiene 0.1 ml de medio TC. Se cultivan las células por la noche y el sobrenadante se aspira y las células se lavan con 0.2 ml de medio TC fresco.

- 20 Los anticuerpos anti-IL-17A que se van a analizar se diluyen en serie en etapas dobles o triples para adar una serie de soluciones madre que puedan utilizarse para crear las concentraciones finales de anticuerpo de 1 a 0.001 $\mu\text{g/ml}$ en el ensayo de inhibición de IL-17A. Un control IgG de rata se

151

utiliza en cada ensayo, así como las muestras únicas de medios, como controles para medier la producción espontánea de IL-6 en células HS68. El medio TC se aspira de los pozos de la placa que contiene las células HS68. Los alícuotas de varias concentraciones de anticuerpo anti-IL-17A (0.1 ml de cada uno) se pre-incuban en pozos con las células HS68 a 37°C por 5 minutos antes de agregar 0.1 ml de 20 ng/ml rhIL-17A, para dar la concentración final de rhIL-17A de 10 ng/ml (aproximadamente 330 pM de dímero IL-17A). Se incuban las células 24 horas a 37°C, y los sobrenadantes (50 – 100 µl) se cosechan y analizan para IL-6, por ejemplo utilizando un kit de IL-6 ELISA humano de Pharmingen (OptEIA – BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, E.U.A.).

EJEMPLO 3

Ensayo de proliferación de Ba/F3-hIL-17Rc-mGCSFR

15

La capacidad de los anticuerpos anti-IL-17A útil en la presente invención para bloquear la actividad biológica de IL-17A se mide al monitorear la proliferación inducida por rhIL-17A en una línea celular diseñada para proliferar en respuesta a la estimulación de IL-17A. Específicamente, la línea celular Ba/F3 cell line (células pro-B de murina dependiente de IL-3) se modificó para expresar una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de un receptor de IL-17A humano (hIL-17RC) fusionado al dominio transmembrana y la región citoplásmica del receptor del factor

20

152

estimulante de la colonia de granulocitos de ratón (GCSFR). Se hace referencia en la presente a la línea celular resultante como Ba/F3 hIL-17Rc-mGCSFR. La unión del IL-17A homodimérico a los dominios de IL-17RC extracelulares causa la dimerización de receptor de proteína de fusión hIL-17Rc-mGCFR, el cual señala la polimerización de las células de Ba/F3 a través de sus dominios citoplásmicos de mGCSFR. Tales células proliferan en respuesta al IL-17A, proveyendo un ensayo conveniente para antagonistas de IL-17A, tales como anticuerpos anti-IL-17A.

La sensibilidad del ensayo de proliferación de Ba/F3-hIL-17Rc-mGCSFR a la estimulación de IL-17A hace posible realizar experimentos a concentraciones relativamente bajas de rhIL-17A (v.gr. 3 ng/ml, 100 pM) en comparación con otros ensayos, a la vez que continúa siendo todavía una respuesta proliferativa fuerte y fácilmente mensurable. Esto significa que se requieren menores concentraciones de anticuerpos anti-IL-17A para lograr un exceso molar sobre RH y IL-17A en el ensayo. Los experimentos realizados a menores concentraciones de anticuerpos hacen posibles discriminar entre los anticuerpos de alta afinidad que de otra manera serían indistinguibles (es decir se pueden realizar experimentos más cercanos a la gama lineal en la curva de unión de anticuerpo IL-17A, mas bien que la meseta).



EJEMPLO 4

Tratamiento de artritis inducida por colágeno usando anticuerpos anti-IL-

17A

5 La artritis inducida por colágeno (CIA) es un modelo ampliamente aceptado en ratones para la artritis reumatoide en humanos. El anticuerpo JLT.1D10 anti-IL-17A de rata, el cual se une al IL-17A de ratón con alta afinidad, se administró a ratones que expresan CIA para evaluar la capacidad de la terapia IL-17A para tratar artritis reumatoide.

10 El procedimiento fue como sigue En el día 0 se inmunizaron intradérmicamente ratones B10.RIII en la base de la cola con colágeno bovino de tipo II emulsificado en adyuvante completo de Freund. En el día 21 se expusieron intradérmicamente ratones con colágeno bovino del tipo II emulsificado en adyuvante incompleto de Freund suministrado en la base de
15 la cola. Cuando ocurrió el primer signo de artritis severa en el grupo inmunizado (después al día 21), se aleatorizaron todos los ratones inmunizados restantes a los varios grupos de tratamiento. Se trataron los animales ya sea con 800 µg, 200 µg o 50 µg de anticuerpo JL7.1D10 anti-IL-17A; 200 µg de anticuerpo de control de isotipo; o diluyente. El JL7.1D10 es
20 un anticuerpo de rata sustituto, neutralizador y de muy alta afinidad, específico para el IL-17A de ratón (IL-17A humano) (en lo sucesivo 1D10). Se proveyeron tratamientos subcutáneamente en el primer día del brote de enfermedad de los ratones inmunizados y luego semanalmente cuatro veces

154

más. Se sacrificaron los ratones en el día 35 y se fijaron las patas en formalina regulada a pH neutro al 10% para el procesamiento y seccionamiento de tejido. Las patas fueron analizadas por un patólogo para los siguientes parámetros de histopatología: sinovio reactivo, inflamación, formación de cartílago articular, destrucción de cartílago, erosión ósea y formación ósea. Se graduó cada parámetro usando la siguiente escala de enfermedad: 0 = ausencia de enfermedad; 1 = mínima, 2 = leve, 3 = moderada, 4 = severa. Además, se evaluaron las patas usando puntuación de severidad de enfermedad (DSS) visual, la cual mide la hinchazón y el enrojecimiento en una escala de 0 a 3, siendo 0 una pata normal, siendo 1 inflamación de un dedo en la pata, siendo 2 inflamación de dos dedos y la palma de la pata, y siendo 3 inflamación de la palma y los dedos de la pata. Se hace referencia en la presente a las puntuaciones de 2 y 3 como patas inflamadas en grado severo o alto.

Se presentan los resultados en las figuras 2A-2C. Cada punto de dato representa una pata, más bien que un promedio para las cuatro patas para un animal o un promedio en todos los animales. La reducción del número de patas que exhibían altas puntuaciones de patología fue estadísticamente significativa por tres medidas de patología (DSS visual - hinchazón y enrojecimiento de pata, daño a cartílago y erosión ósea) con mayores concentraciones de ID10 anti-IL-17A sometidas a prueba (28 y 7 mg/kg). Los resultados con la menor concentración (2 mg/kg) fueron estadísticamente significantes para la erosión ósea, y reducidos para la DSS

155

visual y el daño a cartílago. Se observaron beneficios similares en la reducción de producción de enzimas degradantes de cartílago dentro de las patas inflamadas (metaloproteasas de matriz MMP-2, MMP-3, MMP-13).

La evaluación visual de inflamación de pata, sin embargo, puede subestimar el beneficio terapéutico del tratamiento anti-IL-17A de ratones con CIA, por ejemplo la erosión ósea disminuida. En otros experimentos, se analizaron patas altamente inflamadas (puntuaciones de DSS de 2 ó 3) para ratones con CIA para la erosión ósea, usando histopatológica o tomografía con computadora (micro-CT). Este estudio fue posible porque, aunque los animales tratados con anti-IL-17A tuvieron porcentajes drásticamente reducidos de patas altamente inflamadas (véase, por ejemplo, la figura 2A), quedó un número de patas altamente inflamadas y fue posible comparar patas altamente inflamadas (DSS = 2 ó 3) de todos los grupos de tratamiento, incluyendo los controles sin anticuerpo. La figura 2D muestra una gráfica de erosión ósea para patas altamente inflamadas de animales tratados con diluyente, tratados con control de isotipo (rlgG1) y tratados con anticuerpo anti-IL-17A. La erosión ósea, medida por histopatológica, se redujo significativamente en las patas de animales tratados con anti-IL-17A en comparación con los controles sin anticuerpo, a pesar de sus puntuaciones DSS similares. Los resultados sugieren que se puede lograr prescindir de la erosión ósea con el tratamiento con anti-IL-17A, incluso en las patas en las cuales no hay mejora aparente de la inflamación medida por puntuación DSS.

156

Se obtuvieron resultados similares cuando se usó micro-CT para medir la densidad de mineral en el hueso (BMD) para las articulaciones en patas altamente inflamadas en ratones con CIA. El cuadro 1 provee la BMD para patas con puntuaciones de la severidad de enfermedad de 0 ó 3 de animales CIA tratados ya sea con anticuerpo 1D10 anti-IL-17A o un control de isotipo (25D2). Incluso para las articulaciones con la misma severidad visual de enfermedad, los ratones tratados con anticuerpo 1D10 tuvieron tan solo aproximadamente la mitad de la disminución de la densidad mineral en el hueso, observada con animales tratados con control de isotipo.

10

CUADRO 1

Densidad en el hueso para articulaciones en ratones con CIA

15

Tratamiento	DSS	BMD (mg/cm ³)
25D2	3	95
25D2	3	108
1D10	3	288
1D10	3	299
1D10	0	502
1D10	0	480

20

Como con la erosión ósea, se redujo también la destrucción de cartílago y la formación de cartílago articular (proliferación de revestimiento sinovial que forma pliegues excesivos del tejido inflamado) en ratones con CIA tratados con 1D10. La histopatología mostró que el tratamiento con

15

anticuerpo anti-IL-17A no solamente redujo el número de patas que exhibían patología severa, sino que redujo también la patología en las patas que parecían igualmente inflamadas con base en la inspección visual (puntuaciones DSS de 2 y 3) en comparación con los controles tratados con diluyente o isotipo.

La observación de que el tratamiento con un anticuerpo anti-IL-17A redujo significativamente la erosión ósea en el modelo CIA de la inflamación de articulaciones sugiere que tal terapia puede ser útil en la prevención de los efectos más debilitantes y reversibles de RA en humanos.

Además, la observación de que se reduce la erosión ósea incluso en patas altamente inflamadas sugiere que la simple puntuación visual de la inflamación de articulaciones no puede medir con precisión la eficacia terapéutica. Puede ser necesaria la medición directa o indirecta de la erosión ósea para seguir la pista de los efectos de los tratamientos terapéuticos. Los métodos directos incluyen, pero no se limitan a los mismos, detección estándar de rayos X 2-D, tomografía computarizada (CT), formación de imagen por resonancia magnética (MRI), ultrasonido (US), y centellografía. Véase, por ejemplo, Guermazi et al. (2004) Semin. Musculoskelet. Radiol. 8(4):269-285. Los métodos indirectos incluyen los biomarcadores de destrucción de articulaciones que se describen en la presente.

EJEMPLO 5

Modulación de los niveles de COMP en el suero en ratones con CIA **mediante la terapia anti-IL-17A**

5 Se usó el modelo de artritis en ratones con CIA para evaluar el
efecto de los anticuerpos 1D10 en los niveles en el suero de COMP, la cual es
una proteína no colagénica incorporada a la matriz de cartílago y se libera al
fluido sinovial y al suero enseguida de la proteólisis de cartílago. El fluido
sinovial y el COMP en el suero se pueden presentar también a través de la
10 síntesis repetida (es decir no relacionada con la destrucción de cartílago).

Se inmunizaron ratones B10.RIII y se estimularon con colágeno
de tipo II romano. Después de que los primeros ratones en la cohorte de
ratones inmunizados/estimulados desarrollaron una pata severamente
inflamada, se aleatorizaron todos los ratones para que recibieran terapia. Se
15 suministró SC anticuerpo 1D10 de isotipo o anti-ratón de rata semanalmente
durante 5 semanas. Se hicieron sangrar los ratones antes de la 2a., 3a., 4a. y
5a. dosis y luego durante el sacrificio. Se hicieron sangrar ratones no
manipulados para determinar la gama normal de COMP en el suero en
ausencia de enfermedad. Se midieron los niveles de COMP en el suero en
20 ratones con CIA usando un ELISA comercial de COMP de animal (MD
Biosciences, St. Paul, Minnesota).

Se muestran los resultados en la figura 3A: la barra horizontal
continua denota el COMP medio en el suero en animales no enfermos

59

(círculos grises a la izquierda de las gráficas) y las dos barras horizontales punteadas denota ± 2 desviaciones estándar a partir del promedio en ratones no enfermos. Nótese el único ratón no enfermo estadísticamente heterogéneo que desvía significativamente las barras horizontales punteadas

5 lejos del promedio.

Los resultados de este experimento muestran que los ratones artríticos han elevado los niveles de COMP en el suero en comparación con la gama de niveles de COMP en el suero, vistos en ratones no artríticos, y que la exposición a un anticuerpo anti-IL-17A disminuyó los niveles elevados de

10 COMP en el suero en los ratones cebados para obtener CIA. Estos niveles disminuidos de COMP se correlacionaron con la destrucción reducida de cartílago que evidencian los datos de histología de articulaciones, obtenidos en el mismo experimento usando métodos histológicos estándar (datos no mostrados).

15 Para evaluar la dependencia de la dosis de la terapia anti-IL-17A en los niveles de COMP en el suero, se realizó un segundo experimento como el que se describe anteriormente, excepto que la dosis semanal de anticuerpo 1D10 anti-IL-17A fue de 28 mg/kg, 7 mg/kg o 2 mg/kg. No se observaron cambios en los niveles de COMP con la dosis 2 mg/kg; sin embargo, se

20 observó una tendencia hacia los niveles disminuidos de COMP en ratones con CIA tratados con cualquiera de las dos dosis más altas, como se muestra en la figura 3A.

NO

Se investigó el efecto de la terapia anti-IL-17A a corto plazo en los niveles de COMP en el suero en ratones severamente artríticos. Se inmunizaron ratones B10.RIII y se estimularon con colágeno de tipo II. Se examinó cada ratón y se trató con una dosis única de isotipo (IgG1 de rata) o anticuerpo 1D10 (28 mg/kg) cuando se exhibía una rata severamente inflamada. Se sacrificaron los ratones siete días después del tratamiento con anticuerpo. Se hicieron sangrar los ratones no manipulados para determinar la gama normal de COMP en el suero en ausencia de enfermedad. Se muestran los resultados en la figura 3B. Los ratones tratados con 1D10 tendieron a reducir el COMP en el suero después de 7 días de exposición al fármaco; por lo tanto, se puede necesitar una exposición más prolongada al fármaco para reducir los niveles de COMP a los niveles no manipulados.

Los resultados de estos experimentos en ratones cebados para obtener CIA y en ratones severamente artríticos son consistentes con la capacidad del 1D10 para inhibir la destrucción de cartílago medida mediante métodos histológicos estándar. Así, es probable que las propiedades de preservación de cartílago del antagonismo IL-17A correlacionado con este marcador en el suero de la destrucción de cartílago y COMP en el suero sean útiles como biomarcador del efecto de la terapia anti-IL-17A en la destrucción de articulaciones en pacientes RA humanos.

161

EJEMPLO 6**Modulación de los niveles de RANKL en el suero en ratones con CIA
mediante terapia anti-IL-17A**

5 Se usó el modelo de artritis en ratones con CIA para evaluar el
efecto de LA terapia anti-IL-17A en los niveles en el suero de RANKL, la cual
es una molécula en la superficie celular expresada por células T activadas,
sinoviocitos y osteoblastos que regulan la transición de desarrollo de
preosteoclastos a osteoclastos maduros. Se eleva el RANKL en el suero en el
10 RA humano.

Se inmunizaron ratones B10.RIII y se estimularon con colágeno
de tipo II. Después de que los primeros ratones en la cohorte de ratones
inmunizados/estimulados desarrollaron una pata severamente inflamada, se
aleatorizaron todos los ratones para que recibieran terapia. Se suministró SC
15 vehículo, anticuerpo de isotipo o una de tres dosis diferentes de anticuerpo
1D10 semanalmente durante 5 semanas. Se hicieron sangrar los ratones
antes de la 2a., 3a., 4a. y 5a. dosis y luego durante el sacrificio. Se hicieron
sangrar ratones no manipulados para determinar la gama normal de RANKL
en el suero en la ausencia de enfermedad. Se muestran los resultados en la
20 figura 4: la barra horizontal continua denota el nivel medio de RANKL en el
suero en animales no enfermos (círculos grises a la izquierda de las gráficas)
y las dos barras horizontales punteadas denotan +/- 2 desviaciones estándar
del promedio de ratones no enfermos.

162

Los ratones no enfermos (barra continua, círculos grises) tienen niveles detectables de RANKL en el suero, pero los ratones artríticos tienen niveles elevados (vehículo). La exposición al anticuerpo 1D10 disminuyó los niveles elevados de RANKL en el suero en los ratones cebados para obtener

5 la CIA en comparación con el isotipo (IgG1 de rata), la dosis más alta (28 mg/kg) produciendo el nivel de RANKL en el suero para cada animal dentro de la gama normal. Significativamente, esta dosis de 1D10 es también efectiva para inhibir la erosión ósea medida mediante métodos histológicos estándar. Así, puesto que las propiedades de preservación de hueso del

10 antagonismo de IL-17A se correlacionaron con el marcador en el suero de la destrucción de hueso, es probable que el RANKL sea útil como biomarcador del efecto de la terapia anti-IL-17A en la destrucción de articulaciones en pacientes RA humanos. Estos resultados sugieren también que el IL-17A endógeno desempeña un papel importante en la producción de RANKL en

15 ratones con CIA y que la inhibición de la expresión RANKL por el anticuerpo 1D10 anti-IL-17A puede explicar parcialmente por qué este anticuerpo inhibió la erosión ósea de articulación, incluso en las pocas patas que se pusieron severamente hinchadas.

163

EJEMPLO 7**Modulación de los niveles de OPG en el suero en ratones con CIA****mediante la terapia de anti-IL-17A**

5 Se usó el modelo de artritis en ratones con CIA para evaluar el efecto de la terapia anti-IL-17A en los niveles en el suero de OPG, el cual es un factor soluble que se une al RANKL de la superficie celular y al RANKL soluble en que antagoniza el RANKL para que no suministre la señal de desarrollo a los preosteoclastos. Se elevó el OPG en el suero RA humano,
10 como en la RANK, lo cual puede reflejar el intento del organismo por disminuir los efectos elevados del RANKL.

Se inmunizaron ratones B10.RIII y se estimularon con colágeno de tipo normal. Después de que los primeros ratones de la cohorte de ratones inmunizaron/estimulados desarrollaron una pata severamente inflamada, se
15 aleatorizaron todos los ratones para que recibieran terapia. Se suministró SC isotipo o uno de diez semanalmente durante 5 semanas. Se hicieron sangrar los ratones antes de la 2a., 3a., 4a. y 5a. dosis y luego durante el sacrificio. Se hicieron sangrar ratones no manipulados para determinar la gama normal de OPG en el suero en ausencia de enfermedad. Se muestran los resultados
20 en la figura 5.

Los ratones no enfermos tienen niveles detectables de OPG en el suero (círculos grises a la izquierda de las gráficas), pero los ratones artríticos tuvieron niveles elevados (no hay gráfica de dosificación). La

NCP

exposición al anticuerpo 1 de 10 disminuyó los niveles elevados de OPG en el suero en ratones cebados para que obtuvieran CIA, mientras que el control de isotipo no. Así, las propiedades de preservación ósea del antagonismo de IL-17A se correlacionaron con este marcador en el suero de la destrucción de hueso y es probable que el OPG sea útil, como biomarcador del efecto de la terapia con IL-17A en la destrucción de articulaciones en pacientes RA humanos.

EJEMPLO 8

10 Modulación de los niveles de RANKL en el suero en ratones con CIA **mediante la terapia anti- IL-17A a corto plazo**

Se evaluó también el efecto a corto plazo del anticuerpo 1D10 anti-IL-17A y el RANKL en el suero y el OPG en ratones severamente artríticos.

Se inmunizaron ratones de B10.RIII y se estimularon con colágeno de tipo II. Se examinó cada ratón y se trató intravenosamente con una dosis única de 7 mg/kg de isotipo o JL7.1D10 cuando exhibió una parte severamente inflamada ($DSS \geq 2$). Se sacrificaron los ratones siete días después del tratamiento con anticuerpo. Se hicieron sangrar ratones no manipulados para determinar la gama normal de RANKL y OPG en el suero en ausencia de enfermedad. Se cuantificaron las concentraciones de JL7.1D10 en el suero en el transcurso del experimento para confirmar la

S
16

exposición al fármaco a través de todo el experimento (datos no mostrados).

Se realizó el análisis estadístico usando una prueba t variada y un valor p de 0.05 usado para delinear diferencias significantes entre los grupos. Se muestran los resultados de la figura 6.

- 5 Se elevaron también las concentraciones de RANKL y OPG en el suero en ratones severamente artríticos (ratones con $DSS \geq 2$) durante el tratamiento con anticuerpo. En el día 7 posterior al tratamiento, se redujo al mínimo la elevación de los niveles de RANKL en el suero, observados en el grupo de control con isotipo ($p < 0.01$), con el tratamiento con 1D10 (panel izquierdo). La misma exposición a 1D10 no tuvo impacto inmediato en el OPG en el suero elevado (panel derecho), sugiriendo que la disminución compensatoria del OPG requiere más de 7 días de exposición al 1D10 para activarse. Los resultados sustentan además la expectativa de que el RANKL y el OPG a la vez podrían ser biomarcadores sustitutos para la eficacia de la
- 10
- 15 terapia con IL-17A en la inhibición de la destrucción de articulaciones y del reumatismo articulario.

- Cuando se realizó el mismo experimento usando una vía subcutánea (SC) de suministro, se observó un RANKL en el suero significativamente más elevado con o sin neutralización de IL-17A. La
- 20 discrepancia entre los resultados de estos experimentos pueden deberse a una o más de las siguientes razones: vía de dosificación, lote de anticuerpo o variación de la debilidad de la enfermedad después de la estimulación.

166

EJEMPLO 9**Inhibición anti-IL-17A de la destrucción de articulaciones en pacientes
inflamatorios que no responden**

5 Los ejemplos anteriores demuestran que el antagonismo de IL-
17A con el anticuerpo 1D10 disminuyó la erosión ósea incluso en una pata
severamente inflamada mediante histopatología y que el RANKL y el OPG
elevados fueron normalizados por la exposición a 1D10. Las patas de
animales tratadas con anticuerpo de control y 1D10 se sometieron a análisis
10 de micro-CT, como método adicional para evaluar el efecto de 1D10 en el
metabolismo óseo.

Se inmunizaron ratones B10.RIII y se estimularon con colágeno
de tipo II. Después de que los primeros ratones en la cohorte de ratones
inmunizados/estimulados desarrollaron una parte severamente inflamada, se
15 aleatorizaron todos los ratones para que recibieran terapia. Las pocas patas
severamente inflamadas de los ratones tratados con JL7.1D10 se compararon
con las más numerosas patas severamente inflamadas de los ratones
tratados con anticuerpo de control mediante el análisis de rayos X de micro-
CT y se muestran los resultados en la figura 7.

20 Una pata no inflamada no tiene evidencia de erosión ósea en la
superficie articular; sin embargo, una pata severamente inflamada de un ratón
tratado con control tiene una erosión ósea extensa en la superficie articular en
la cual está presente el inmunógeno colágeno de tipo II. Esto es evidenciado

162

por el reemplazo de estructuras óseas densas con rayos X muy definidas en los extremos de los huesos con áreas amorfas densas en rayos X alrededor de las articulaciones. Las pocas articulaciones severamente inflamadas de los ratones tratados con 1D10 tienen evidencia de erosión ósea, pero el grado de erosión ósea es mucho menor que las patas "igualmente inflamadas" de los ratones tratados con control.

Estos resultados de rayos X de micro-CT sustentan el razonamiento de que el antagonismo de IL-17A en pacientes RA dará por resultado la erosión ósea reducida en las articulaciones en comparación con el placebo, incluso en pacientes que continúan teniendo la enfermedad activa evaluada por un conteo de articulaciones sensibles y conteos de articulaciones hinchadas. O expresado de manera diferente, el antagonismo de IL-17A puede desacoplar las señales externas de la inflamación a causa del procedimiento destructivo de articulaciones.

15

EJEMPLO 10

Efecto de la terapia anti-IL-17A en los niveles de TRACP en el suero en ratones con CIA

Se evaluó también el efecto de la terapia anti-IL-17A a largo plazo en los niveles de TRACP en el suero.

Se inmunizaron ratones B10.RIII y se estimularon con colágeno de tipo II. Después de que los primeros ratones en la cohorte de ratones

20

169

inmunizados/estimulados desarrollaron una pata severamente inflamada, se aleatorizaron todos los ratones para que recibieran terapia. Se dosificó isotipo IgG1 de rata de isotipo o JL7.1D10 semanalmente durante 5 semanas. Se hicieron sangrar los ratones durante el sacrificio. Se hicieron sangrar ratones

5 no sometidos previamente de experimentación y no manipulados para determinar la gama normal de TRACP en el suero en ausencia de enfermedad. Se midieron los niveles de TRACP en el suero en ratones con CIA y ratones no manipulados usando un ensayo comercial de TRACP de ratón (IDS, Fountain Hills, AZ).

10 Se elevaron los niveles de TRACP en el suero en los ratones artríticos tratados con el control de rlgG1 de isotipo en comparación con los ratones no enfermos (no manipulados) (figura 8) y se correlacionaron estos niveles elevados de TRACP con el nivel de destrucción ósea en las patas hinchadas de los ratones artríticos (datos nos mostrados). Se observó una

15 ligera tendencia a menores niveles de TRACP en el suero en los ratones artríticos tratados con 1D10, pero este resultado no fue estadísticamente significativo (figura 8). Los inventores creen que el hecho de no ver una reducción estadísticamente significativa de los niveles de TRACP en este experimento puede deberse al instante terminal de sangrado durante el

20 sacrificio en el cual se midieron los niveles de TRACP por las razones discutidas a continuación.

169

EJEMPLO 11**Efecto de la terapia anti-IL-17A en los niveles de CTX-I y CTX-II en el
suero en ratones con CIA**

5 Se inmunizaron ratones B10.RIII y se estimularon con colágeno
de tipo II. Después de que el primer ratón en la cohorte de ratones
inmunizados/estimulados desarrolló una pata severamente inflamada, se
aleatorizaron todos los ratones para que recibieran terapia. Se suministro s.c.
isotipo JL7.1D10 (28, 7 ó 2 mg/kg) semanalmente durante 5 semanas. Se
10 hicieron sangrar los ratones en el día 35 después del tratamiento durante el
sacrificio. Se hicieron sangrar ratones B10-RIII no manipulados para
determinar la gama normal de CTX-I en ausencia de artritis. Se midieron los
niveles de CTX-I en el suero usando el RatLapsTM CTXI ELISA (IDS, Fountain
Hills, AZ), el cual reconoce el CTX-I de ratón. Se midieron los niveles de CTX-
15 II usando el CartiLaps® CTX-II ELISA preclínico y suero (IDS, Fountain Hills,
AZ). Los resultados (no mostrados) indican que (1) el STX-I estuvo presente
en el suero de ratón no manipulado, pero no se elevó en el suero de ratones
artríticos, y (2) el CTX-II estuvo debajo del límite de detección en el suero de
ratón no artrítico (normal) y artrítico. El JL7.1D10 no altera detectablemente
20 los niveles básicos para CTX-I o a CTX-II.

NO

EJEMPLO 12**Efecto de la terapia anti-IL-17A en los niveles de osteocalcina en el suero
en ratones con CIA**

5 Se inmunizaron ratones B10.RIII y se estimularon con colágeno
de tipo II. Después de que el primer ratón en la cohorte de ratones
inmunizados/estimulados desarrolló una pata severamente inflamada, se
aleatorizaron todos los ratones para que recibieran terapia. Se suministró s.c.
isotipo a 22 mg/kg de JL7.1D10 semanalmente durante 5 semanas. Se
10 hicieron sangrar los ratones en el día 35 después del tratamiento durante el
sacrificio. Se hicieron sangrar ratones no manipulados a las 10 se semanas,
14 semanas y 26 semanas de edad para determinar la gama normal de
osteocalcina a través de todo el modelo de artritis. Se midieron los niveles de
osteocalcina en el suero usando un ensaye comercial de ELISA de
15 intercalación de osteocalcina de ratón (Biomedical Technologies Inc.,
Stoughton, MA). Se muestran los resultados en la figura 9.

 Los ratones artríticos tratados con el control de isótopo habían
disminuido los niveles de osteocalcina en comparación con los niveles en los
ratones no manipulados (normales). Aunque el tratamiento con el anticuerpo
20 JL7.1D10 no moduló significativamente estos niveles, hubo una tendencia a la
normalización de los niveles disminuidos de osteocalcina por JL7.1D10.

EJEMPLO 13**Dinámica de los niveles de RANKL y OPG en el suero conforme los ratones progresa a través del modelo CIA**

5 Se inmunizaron machos de ratones B10.RII con CII en CFA y
hicieron sangrar semanalmente durante 3 semanas durante el período de
inducción (Untxt). Se estimularon nuevos ratones con CII en IFA y se
aleatorizaron a varios grupos de tratamiento en el primer signo en la
hinchazón severa de pata. Se dosificaron algunos ratones con 7-30 mg/kg de
10 anticuerpos de control 25D2 ó 27F11 subcutáneamente cada semana durante
5 semanas. Se combinaron los resultados de 5 experimentos independientes
y se expresaron como medio $\pm$ SEM de grupos artríticos (n = 10-30). Se
muestran los resultados en la figura 10.

 Como se ve en la panel izquierdo de la 10, los niveles de
15 RANKL en el suero aumentaron a partir de la segunda semana de la fase de
efector (progresión de enfermedad) y permanecieron elevados en la cohorte
de ratones inmunizados/estimulados durante 4 semanas después de la
estimulación en comparación con los ratones de control no manipulados
(líneas horizontales). Los niveles elevados de OPG en el suero, en cambio,
20 aparecieron en la primera semana de la fase de inducción y estaban
regresando a la línea de base en la segunda semana de la fase de efector
(figura 10, panel derecho). Estos resultados indican que los niveles de RANKL
del suero se elevaron durante la fase de progresión de la enfermedad del

172

modelo, cuando ocurre la erosión ósea y la articulación dentro de patas
artríticas severamente hinchadas. El antagonista natural de RANKL, OPG,
que se había elevado durante la fase de inducción, estaba de nuevo en los
niveles fisiológicos normales cuando el RANKL de proosteoclasto estaba
5 comenzando a ascender en el suero. Los niveles de OPG en el suero fueron
5-10 veces mayores que los niveles RANKL en el suero independientemente
del instante en que se examinaron. El RANKL incrementado en el suero forma
muy probablemente complejos con los niveles más altos de OPG en el suero
y se neutraliza.

10

EJEMPLO 14

Correlación del RANKL elevado con la hinchazón de patas en ratones

con CIA

15 Los datos discutidos en el ejemplo 13 muestran que el RANKL
en el suero se eleva en el modelo CIA por cierto transcurso en el tiempo y
datos previos mostraron que ocurría la hinchazón de patas por un transcurso
similar de tiempo. Para evaluar el grado de correlación entre los niveles de
RANKL en el suero y la hinchazón de patas se inmunizaron ratones, se
20 estimularon, se aleatorizaron al tratamiento en la primer señal de hinchazón
severa de patas, y se trataron luego con anticuerpo de control de isotipo de
IgG1 de rata subcutáneamente cada semana durante 5 semanas. Se recopiló
la concentración de RANKL en el suero de cada semana con respecto a la

DSS total de los animales de los ratones individuales a partir de cuatro experimentos independientes y se realizó el análisis estadístico de los datos usando análisis Kruskal-Wallis no paramétrico.

La figura 11 muestra la asociación resultante de instantáneas
5 semana por semana entre los niveles de RANKL en el suero y la actividad de enfermedad en ratones con CIA tratados con el anticuerpo de control de isotipo. Los niveles de RANKL del suero se elevaron solamente en aquellos ratones que tenían por lo menos una pata severamente hinchada (DSS = 2-3)
10 en la semana 2 o que tenían múltiples patas severamente hinchadas (DSS > 3) a partir de las semanas 3-5. Importantemente, los ratones inmunizados e estimulados que no habían iniciado alguna respuesta de hinchazón de pata (DSS = 0) o que iniciaron solamente una leve respuesta a la hinchazón de pata solamente en una pata (DSS = 1) no mostraron señales de RANKL elevado en el suero en ningún instante. Un nivel semanal similar entre los
15 niveles de RANKL en el suero y la actividad de enfermedad en ratones con CIA se observó cuando se trataron ratones con diferente anticuerpo de control (anticuerpo 27F11 de IgG1 de ratón). Los datos con ambos anticuerpos de control sustentan una conclusión de que los niveles de RANKL en el suero se elevaron en ratones con CIA en la semana 2 y más de una vez los ratones
20 demostraron por lo menos una pata severamente hinchada y no fue a la inversa e meramente una reflexión del tiempo después de la exposición, es decir los ratones inmunizados/estimulados sin señales de hinchazón de pata no tuvieron RANKL elevado en el suero.

17/1

Los estudios de la evaluación de la histología de la pata anexa concluyeron que la erosión ósea importante únicamente ocurrió en patas severamente hinchadas (DSS=2-3), no en patas mínimamente hinchadas (DSS=1) y no en patas no hinchadas de ratones con "otras patas" severamente hinchadas (DSS=0). Por lo tanto, los inventores en la presente creen que el RANKL en suero elevado se correlaciona directamente con la erosión ósea en progreso en el modelo de CIA y que el RANKL en suero puede utilizarse como un marcador de PK-PD para seguir la respuesta a terapias experimentales o aprobadas que impactan la osteoclastogénesis, y además que este marcador puede ser evaluado antes de o en lugar de determinar los resultados terapéuticos con técnicas de histopatología de la articulación estándar.

EJEMPLO 15

15 Ratones con múltiples patas severamente hinchadas tienen niveles de OPG en suero elevado

Para evaluar el transcurso en el tiempo de la correlación entre los niveles de OPG en suero y la hinchazón de las patas, el experimento descrito en el ejemplo 14 se repitió utilizando un anticuerpo de control de isotipo IgG1 en ratas o un anticuerpo de control de isotipo IgG1 en ratones y midiendo los niveles de OPG en suero en lugar de los anticuerpos de RANKL.

Los resultados con el control de isotipo de IgG1 en ratas se muestran en la figura 12.

Una proporción de ratones aún no artríticos (DSS=0) en la semana 1 tuvo niveles de OPG en suero elevados que aún estaban presentes debido a la elevación de OPG de la fase de inducción del modelo. En contraste con los datos generados en el ejemplo 13, en donde los niveles de OPG en suero promedio en ratones "del grupo de inmunizados y estimulados" cayeron en la escala fisiológica de dos semanas en adelante (figura 10, panel derecho), la figura 12 muestra una fotografía diferente. Los niveles de OPG en suero fueron "re-elevados" en pocos ratones con múltiples patas severamente hinchadas en la semana 2 con respecto a los otros miembros más numerosos del grupo que aún no son artríticos. Los ratones con múltiples patas severamente hinchadas en los últimos puntos en el tiempo no mostraron OPG en suero en gran medida elevados.

Un perfil semanal similar de niveles de OPG en suero y DSS en ratones se obtuvo cuando los ratones fueron dosificados con control de isotipo IgG1 en ratones (los datos no se muestran). En particular, los niveles de OPG en suero elevados únicamente se observaron en ratones con múltiples patas severamente hinchadas con el nivel en la semana 2 estadísticamente más importante y tendencias hacia la significancia se observan en las semanas 3-4.

La asociación descrita anteriormente entre la hinchazón severa de las patas y OPG en suero elevadas únicamente se observó cuando el grupo

de ratones inmunizados y estimulados fueron analizados por separado con base en la severidad de la enfermedad. Esto se debe a la respuesta bifásica de OPG en el modelo de CIA en donde éste se elevó en la fase de inducción y cayó a lo largo de la fase efectora superpuesta en un segundo perfil de se re-elevado en ratones con múltiples patas severamente hinchadas.

EJEMPLO 16

JL7.1D10 reduce los niveles de RANKL en suero asociado a artritis

Los resultados discutidos en los ejemplos anteriores muestran (1) que RANKL en suero elevado y OPG se observaron en ratones que progresaron para tener al menos una pata severamente hinchada y (2) que la neutralización de IL-17A inhibió la erosión ósea, incluso en pocas patas severamente hinchadas que se observaron.

Para evaluar si la neutralización anti-IL-17A modula la elevación relacionada con la artritis severa en niveles de RANKL, los ratones fueron inmunizados, desafiados, aleatorizados para tratamiento en el primer signo de hinchazón severas de patas, y posteriormente fueron tratados subcutáneamente en forma semanal durante 5 semanas con 7 mg/kg de control de isotipo IgG1 en ratas (25D2) mAb, o 2, 7 o 28 mg/kg de JL7.1D10 mAb. Las concentraciones de fármaco en suero fueron cuantificadas durante el transcurso del experimento para confirmar la exposición de fármaco a lo largo del experimento. Los niveles de RANKL en suero fueron planificados

con el tiempo de ratones individuales y los resultados se muestran en la figura 13.

Los niveles de RANKL en suero fueron elevados en ratones de control no tratados y de isotipo (figura 13, izquierdo superior y derecho) durante el transcurso del tiempo del modelo de CIA, como se muestra también en la figura 10 (panel izquierdo). La dosificación con ≥ 7 mg/kg de JL7.1D10 semanalmente durante 5 semanas atenuó los niveles de RANKL en suero elevados relacionados con artritis (figura 13, panel medio inferior). Estos resultados indican que la IL-17A endógeno juega un papel principal en la producción de RANKL en ratones de CIA y que la inhibición de JL7.1D10 de la expresión de RANKL puede ser parcialmente la explicación de por qué JL7.1D10 inhibió la erosión ósea de la articulación, incluso en algunas patas que se hincharon severamente.

Análisis adicionales de los datos presentados en las figuras 11 y 13 muestran que hubo mucho menos ratones con artritis severa y muchos más ratones sin artritis en los grupos tratados con JL7.1D10, y que los niveles de RANKL en suero fueron disminuidos incluso en los pocos ratones tratados con JL7.1D10 que progresaron para tener múltiples patas severamente hinchadas en comparación con los ratones tratados de control clínicamente iguales (los datos no se muestran). Este resultado fue estadísticamente importante en la semana 4 y ninguna tendencia importante se observó en las semanas 2, 3 y 5.

128

EJEMPLO 17**JL7.1D10 normaliza los niveles de OPG en suero tempranamente en la etapa de progreso de la enfermedad**

5 Como se discutió anteriormente, la regulación de niveles de OPG en suero es muy compleja en el modelo de CIA de ratón como se evidencia por un componente bifásico de la expresión de OPG (es decir, la elevación en la fase de inducción y una disminución lenta en la fase de progreso de la enfermedad) que se sobrepone en un incremento relacionado con múltiples patas severamente hinchadas en OPG en suero en la fase de

10 progreso de la enfermedad. Para evaluar si la neutralización de IL-17A dentro de esta regulación compleja demostró cualquier modulación convincente, los ratones fueron inmunizados, desafiados, aleatorizados para tratamiento en el primer signo de hinchazón severa de las patas, y posteriormente se trataron

15 subcutáneamente en forma semanal durante 5 semanas con 7 mg/kg de control de isotipo IgG1 en ratas (25D2) mAb o 28 mg/kg de JL7.1D10 mAb. Las concentraciones de fármaco en suero fueron cuantificadas durante el transcurso del experimento para confirmar la exposición de fármaco a lo largo del experimento. Los perfiles de OPG en suero semanales de ratones

20 individuales se presentan en la figura 14.

Las concentraciones de OPG en suero aún son elevadas en ratones de control no tratados y de isotipo en el primer punto en el tiempo estudiado en la fase de progreso de la enfermedad y el nivel de OPG

RA

promedio en el grupo de ratones disminuyó con el tiempo, pero con un perfil muy heterogéneo dentro del grupo. Las inyecciones semanales de 28 mg/kg de JL7.1D10 durante cinco semanas redujeron notablemente los niveles de OPG en suero a niveles casi uniformes dentro de la escala fisiológica por medio del post-estímulo posterior de la segunda semana (figura 14 panel derecho).

Pero para evaluar cómo la neutralización de IL-17A afectó los niveles de OPG “re-elevados” en algunos ratones con “múltiples patas severamente hinchadas” que se rompieron a través de la terapia con anti-IL-17A, se realizaron análisis adicionales de los datos presentados en las figuras 12 y 14 para medir el efecto de la neutralización de IL-17A en la correlación entre las concentraciones de OPG en suero contra ratones con “múltiples patas severamente hinchadas”. JL7.1D10 redujo los niveles de OPG en suero en ratones con múltiples patas severamente hinchadas (DSS>3) estadísticamente en la semana 5 y con tendencias en los puntos en el tiempo previos (los datos no se muestran).

EJEMPLO 18

Efecto de IL-17A en RANKL en suero y niveles de OPG en ratones no enfermos

Los datos discutidos anteriormente indican que IL-17A juega un papel importante en RANKL y producción de OPG en ratones artríticos y que

la neutralización de IL-17A inhibe la erosión ósea relacionada con artritis en ratones supuestamente al inhibir la diferenciación/actividad osteoclástica. Para evaluar si la IL-17A endógena tiene un papel importante en la homeostasis ósea normal, el RANKL en suero o los niveles de OPG se midieron en ratones B10.RIII normales antes y durante los tratamientos de cinco semanas de 28 mg/kg J de L7.1D10 subcutáneamente. El tratamiento con 1D10 no alteró el RANKL en suero fisiológico o los niveles de OPG en estos ratones normales, un resultado consistente con la conclusión de que IL-17A endógeno no es crítico para RANKL no hinchado fisiológico y para biología ósea mediada por OPG en ratones normales.

EJEMPLO 19

Tratamiento anti-IL-17A eficaz en artritis inducida por adyuvante en ratas

La artritis inducida por adyuvante en ratas (AIA) es otro ejemplo de un modelo de erosión ósea severa. El modelo se inicia mediante una sola inyección del adyuvante de Freund completo (CFA) en la base de la cola, y las respuestas de la hinchazón de la articulación simétrica iniciaron en el día 10 al día 13, y la erosión ósea severa se observó en el día 21.

Para investigar el papel de IL-17A en el modelo de AIA, se identificó un anticuerpo que une y neutraliza la IL-17A en ratas (JL8.18E10). Iniciando antes de la inyección de CFA, las ratas Agouti oscuras fueron tratadas con dosis semanales de un anticuerpo de isotipo o 0.8 ó 20 mg/kg de

JL8.18E10. Los datos, que se muestran en la figura 15, indican que cada dosis de JL8.18E10 evitó totalmente el inicio de la artritis. Experimentos similares utilizando el modelo de AIA en ratas estableció que JL8.18E10 inhibió la hinchazón de las articulaciones si se administra en el día 10 (inicio de la enfermedad) o día 12 (enfermedad establecida) y también podría inhibir la pérdida de peso severa lo cual es una propiedad de las ratas con AIA (los datos no se muestran).

Para investigar si la neutralización de IL-17A afecta los niveles de RANKL en el modelo de AIA en ratas, se midió RANKL en suero cosechado en el sacrificio de ratas dosificadas preventivamente o al inicio de la enfermedad con JL8.18E10 o un control de isotipo. JL8.18E10 disminuyó el RANKL en suero en ambos modos de tratamiento en comparación con las ratas tratadas con isotipo (los datos no se muestran).

15

EJEMPLO 20

Tratamiento anti-IL-17A reduce el RANKL en suero elevado relacionado con artritis en artritis inducida por adyuvante en ratas

Para evaluar el efecto de la neutralización de IL-17A en RANKL en el modelo de AIA, las ratas con la enfermedad establecida fueron tratadas con 20 mg/kg de un control de isotipo, se les da cada tres días una dosis individual de 4 mg/kg ó 20 mg/kg de JL8.18E10 o una dosis de 25 mg/kg de un antagonista de TNF (etanercept). Las ratas fueron desangradas en el día 8

182

(antes de la hinchazón de la articulación), día 14 (tres días después del tratamiento con anticuerpo), y en el día 25 fueron sacrificadas. RANKL en suero se midió en cada punto en el tiempo y los resultados se muestran en la figura 16.

- 5 Únicamente tres días de tratamiento con JL8.18E10 fueron necesarios para inhibir el RANKL en suero elevado relacionado con artritis, mientras tres días de antagonismo con TNF no fueron tan efectivos para modular el RANKL en suero. Debe notarse que, en el día 14, las ratas con JL8.18E10 aún eran artríticas pero sus niveles de RANKL en suero habían
- 10 sido normalizados.

- La mención de las publicaciones o documentos anteriores no intenta ser una admisión de que cualquiera de lo anterior sea técnica anterior pertinente, ni constituye ninguna admisión en cuanto a los contenidos o la fecha de estas publicaciones o documentos. Todas las referencias
- 15 (publicaciones, números de acceso, solicitudes de patente y patentes) mencionadas anteriormente se incorporan expresamente por referencia al mismo grado como si cada publicación individual, numero de acceso, solicitud de patente o patente se indicará específica e individualmente para incorporarse por referencia.

183

NOVEDAD DE LA INVENCIÓN

REIVINDICACIONES

5 1.- Un método para seleccionar un paciente con un reumatismo inflamatorio para tratamiento con un antagonista de IL-17A, que comprende a. comparar el nivel de al menos un biomarcador de destrucción de articulaciones en una muestra de suero tomada del sujeto con la escala normal de niveles séricos para el biomarcador; y b. seleccionar el paciente
10 para tratamiento con el antagonista de IL-17A si el nivel del biomarcador de destrucción de articulaciones en la muestra de suero del sujeto está fuera de la escala normal.

 2.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el biomarcador de destrucción de articulaciones
15 se selecciona del grupo que consiste en proteína de matriz de oligómero en cartílago (COMP), telopéptido de entrelazamiento C-terminal de colágeno tipo I (CTX-I), telopéptido de entrelazamiento C-terminal de colágeno tipo II (CTX-II), glicoproteína-39 de cartílago humano (HC gp-39), osteoprotegrina (OPG), activador receptor de ligando NF κ B (RANKL), osteocalcina e isoforma 5b de
20 la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRACP).

 3.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el paciente es un paciente inflamatorio que no responde a tratamiento previo con un fármaco antirreumático diferente.

184

4.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el paciente es un paciente inflamatorio que responde a tratamiento previo con un fármaco antirreumático diferente.

5 5.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el biomarcador de destrucción de articulaciones es RANKL, COMP u OPG.

6.- El método de conformidad con la reivindicación 5, caracterizado además porque el biomarcador de destrucción de articulaciones es RANKL.

10 7.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el paso de comparación se realiza en cada uno de RANKL COMP y OPG.

15 8.- El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el antagonista de IL-17A es un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo monoclonal que se une a e inhibe la actividad de IL-17A humana.

9.- El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque el antagonista de IL-17A es un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

20 10.- El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque el antagonista de IL-17A es un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado o un fragmento de anticuerpo monoclonal totalmente humano.

11.- El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo monoclonal está pegilado.

12.- El método de conformidad con la reivindicación 1,
5 caracterizado además porque el reumatismo inflamatorio es artritis reumatoide, artritis psoriática o espondilitis anquilosante.

13.- El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado además porque el reumatismo inflamatorio es artritis reumatoide.

10 14.- El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado además porque el antagonista de IL-17A es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende una cadena ligera que tiene SEQ ID NO:1 y una cadena pesada que tiene SEQ ID NO:2.

15 15.- Un método para predecir eficacia de un antagonista de IL-17A en la inhibición de erosión ósea en un sujeto con un reumatismo inflamatorio, que comprende: a. determinar el nivel de al menos un biomarcador de destrucción de articulaciones en una primera muestra de suero tomada del sujeto antes de un periodo de tratamiento inicial con el antagonista de IL-17A; b. determinar el nivel del biomarcador de destrucción
20 de articulaciones en al menos una segunda muestra de suero tomada del al final del periodo de tratamiento inicial; y c. comparar los niveles del biomarcador de destrucción de articulaciones en la primera y segunda muestras de suero; en donde una normalización del nivel del biomarcador de

186

destrucción de articulaciones en la segunda muestra de suero comparada con el nivel en la primera muestra de suero predice que el antagonista de IL-17A probablemente será efectivo para inhibir la destrucción de articulaciones en el sujeto, y en donde el sujeto es un humano o un animal no humano.

5 16.- El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque el biomarcador de destrucción de articulaciones se selecciona del grupo que consiste en proteína de matriz de oligómero en cartílago (COMP), telopéptido de entrelazamiento C-terminal de colágeno tipo I (CTX-I), telopéptido de entrelazamiento C-terminal de colágeno tipo II (CTX-
10 II), glicoproteína-39 de cartílago humano (HC gp-39), osteoprotegrina (OPG), activador receptor de ligando NF κ B (RANKL), osteocalcina e isoforma 5b de la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRACP).

15 17.- El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque el periodo de tratamiento inicial es al menos una semana, al menos dos semanas, al menos cuatro semanas, al menos ocho semanas, al menos doce semanas, al menos dieciocho semanas, al menos veinticuatro semanas o al menos cuarenta y ocho semanas.

20 18.- El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque comprende adicionalmente comparar el nivel del biomarcador en la primera y segunda muestras de suero con la escala normal de niveles séricos del biomarcador, en donde se predice que el antagonista de IL-17A será efectivo para inhibir destrucción de articulaciones en el sujeto si el nivel del biomarcador de

destrucción de articulaciones en la primera muestra de suero está fuera de la escala normal y el nivel del biomarcador en la segunda muestra de suero está dentro de la escala normal.

19.- El método de conformidad con la reivindicación 15,
5 caracterizado además porque comprende adicionalmente determinar el nivel del biomarcador de destrucción de articulaciones en una tercera muestra de suero tomada del sujeto al final de al menos un periodo de tratamiento posterior con el antagonista de IL-17A, en donde un nivel del biomarcador en la tercera muestra de suero que está más normalizado que el nivel del
10 biomarcador en la segunda muestra de suero predice que el antagonista de IL-17A probablemente será efectivo para inhibir destrucción de articulaciones en el sujeto.

20.- El método de conformidad con la reivindicación 19,
caracterizado además porque el periodo de tratamiento posterior es al menos
15 12 semanas, al menos 24 semanas o al menos 48 semanas.

21.- El método de conformidad con la reivindicación 15,
caracterizado además porque el biomarcador es RANKL, COMP u OPG.

22.- El método de conformidad con la reivindicación 15,
caracterizado además porque el biomarcador es RANKL.

20 23.- El método de conformidad con la reivindicación 15,
caracterizado además porque los pasos de determinar y comparar se realizan en cada uno de RANKL y COMP o en cada uno de RANKL, COMP y OPG.

24.- El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque el antagonista de IL-17A es un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo monoclonal que se une a e inhibe la actividad de IL-17A.

5 25.- El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque el sujeto es un humano y el antagonista de IL-17A es un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal totalmente humano.

10 26.- El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque el sujeto es un humano y el antagonista de IL-17A es un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado o un fragmento de anticuerpo monoclonal totalmente humano.

15 27.- El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo monoclonal está pegilado.

20 28.- El método de conformidad con la reivindicación 24, caracterizado además porque el antagonista de IL-17A es un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal totalmente humano y mientras el sujeto es tratado durante el periodo de tratamiento inicial con una dosis del anticuerpo que ha mostrado ser efectivo para inhibir destrucción de articulaciones en una población de sujetos con el reumatismo inflamatorio.

889

29.- El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque el reumatismo inflamatorio es artritis reumatoide, artritis psoriática o espondilitis anquilosante.

30.- El método de conformidad con la reivindicación 29,
5 caracterizado además porque el reumatismo inflamatorio es artritis reumatoide.

31.- El método de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado además porque el antagonista de IL-17A es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende una cadena ligera que tiene SEQ ID
10 NO:1 y una cadena pesada que tiene SEQ ID NO:2.

32.- El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado además porque el sujeto es un sujeto inflamatorio que no responde a tratamiento previo con un fármaco antirreumático diferente.

33.- El método de conformidad con la reivindicación 15,
15 caracterizado además porque el sujeto es un sujeto inflamatorio que responde a tratamiento previo con un fármaco antirreumático diferente.

34.- Un método para tratar un sujeto para un reumatismo inflamatorio con un antagonista de IL-17A, que comprende a. determinar el nivel de al menos un biomarcador de destrucción de articulaciones en una
20 primera muestra de suero tomada del sujeto; b. administrar el antagonista de IL-17A al sujeto de acuerdo con un primer régimen de dosificación durante un periodo de tratamiento inicial; c. determinar el nivel del biomarcador de destrucción de articulaciones en al menos una segunda muestra de suero

261

tomada del paciente al final del periodo de tratamiento inicial; y d. comparar los niveles del biomarcador en la primera y segunda muestras de suero; y d. administrar el antagonista de IL-17A al sujeto de acuerdo con el primer régimen de dosificación durante al menos un periodo de tratamiento posterior

5 si el nivel del biomarcador en la segunda muestra de suero está dentro de una escala especificada; o e. administrar el antagonista de IL-17A al sujeto de acuerdo con un segundo régimen de dosificación durante al menos un periodo de tratamiento posterior si el nivel del biomarcador en la segunda muestra de suero está fuera de la escala especificada, en donde el segundo

10 régimen de dosificación comprende administrar una cantidad total del antagonista de IL-17A durante el periodo de tratamiento posterior que es mayor que la cantidad total administrada durante el periodo de tratamiento inicial, en donde la escala especificada se selecciona del grupo que consiste en: (i) la escala de niveles séricos del biomarcador de destrucción de

15 articulaciones encontrado en sujetos no tratados que no tienen el reumatismo inflamatorio; y (ii) la escala definida por un intervalo de confianza de al menos 80% del nivel medio del biomarcador de destrucción de articulaciones medido en una población de sujetos con el reumatismo inflamatorio quienes fueron tratados con el antagonista de IL-17A de acuerdo con el primer régimen de

20 dosificación durante un periodo igual o mayor que el periodo de tratamiento inicial, en donde la población exhibió una inhibición de destrucción de articulaciones después de tratamiento con el antagonista de IL-17A de

191

acuerdo con el primer régimen de dosificación durante un periodo igual o mayor que el periodo de tratamiento posterior.

35.- El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado además porque el biomarcador de destrucción de articulaciones se selecciona del grupo que consiste en proteína de matriz de oligómero en cartílago (COMP), telopéptido de entrelazamiento C-terminal de colágeno tipo I (CTX-I), telopéptido de entrelazamiento C-terminal de colágeno tipo II (CTX-II), glicoproteína-39 de cartílago humano (HC gp-39), osteoprotegrina (OPG), activador receptor de ligando NF κ B (RANKL), osteocalcina e isoforma 5b de la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRACP).

36.- El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado además porque la escala especificada está definida por un intervalo de confianza de al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% del nivel medio del biomarcador de destrucción de articulaciones medido en una población de sujetos con la enfermedad inflamatoria que fueron tratados con el antagonista de IL-17A de acuerdo con el primer régimen de dosificación durante un periodo inicial de al menos 4 semanas, en donde la población exhibió una inhibición de destrucción de articulaciones después de tratamiento con el antagonista de IL-17A de acuerdo con el primer régimen de dosificación durante un periodo de tratamiento posterior de al menos 12 semanas.

37.- El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado además porque el periodo de tratamiento inicial es al menos

una semana, al menos dos semanas, al menos cuatro semanas, al menos ocho semanas o al menos doce semanas.

38.- El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado además porque el periodo de tratamiento posterior es al menos
5 12 semanas, al menos 24 semanas o al menos 48 semanas.

39.- El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado además porque el biomarcador de destrucción de articulaciones es RANKL.

40.- El método de conformidad con la reivindicación 34,
10 caracterizado además porque el reumatismo inflamatorio es artritis reumatoide, artritis psoriática o espondilitis anquilosante.

41.- El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado además porque el sujeto es un humano, el reumatismo inflamatorio es artritis reumatoide y el antagonista de IL-17A es un anticuerpo
15 monoclonal humanizado que comprende una cadena ligera que tiene SEQ ID NO:1 y una cadena pesada que tiene SEQ ID NO:2.

42.- El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado además porque el sujeto es un sujeto inflamatorio que no responde a tratamiento previo con un fármaco antirreumático diferente.

20 43.- El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado además porque el sujeto es un sujeto inflamatorio que responde a tratamiento previo con un fármaco antirreumático diferente.

44.- El método de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado además porque el antagonista de IL-17 es un anticuerpo que no se une a IL-23 y el método comprende además administrar un antagonista de IL-23 al paciente durante el periodo de tratamiento inicial, durante el periodo
5 de tratamiento posterior, o durante ambos periodos inicial y posterior de tratamiento.

45.- Un kit para tratar un reumatismo inflamatorio, en donde el kit comprende una composición farmacéutica y reactivos para medir el nivel de al menos un biomarcador de destrucción de articulaciones en una muestra
10 de suero tomada de un sujeto, en donde la composición farmacéutica comprende un antagonista de IL-17A y el biomarcador de destrucción de articulaciones se selecciona del grupo que consiste en proteína de matriz de oligómero en cartílago (COMP), telopéptido de entrelazamiento C-terminal de colágeno tipo I (CTX-I), telopéptido de entrelazamiento C-terminal de
15 colágeno tipo II (CTX-II), glicoproteína-39 de cartílago humano (HC gp-39), osteoprotegrina (OPG), activador receptor de ligando NF κ B (RANKL), osteocalcina e isoforma 5b de la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRACP).

46.- El kit de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado
20 además porque el reumatismo inflamatorio es artritis reumatoide, el antagonista de IL-17A es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende una cadena ligera que tiene SEQ ID NO:1 y una cadena pesada

1998

que tiene SEQ ID NO:2, y el biomarcador de destrucción de articulaciones es RANKL.

47.- Un producto de fármaco fabricado para tratar un reumatismo inflamatorio, que comprende una formulación farmacéutica que
5 comprende un antagonista de IL-17A e instrucciones para determinar niveles séricos en el paciente de al menos un biomarcador de destrucción de articulaciones antes y durante tratamiento con el antagonista de IL-17A.

48.- El producto de fármaco fabricado de conformidad con la reivindicación 47, caracterizado además porque el biomarcador de
10 destrucción de articulaciones se selecciona del grupo que consiste en proteína de matriz de oligómero en cartílago (COMP), telopéptido de entrelazamiento C-terminal de colágeno tipo I (CTX-I), telopéptido de entrelazamiento C-terminal de colágeno tipo II (CTX-II), glicoproteína-39 de cartílago humano (HC gp-39), osteoprotegrina (OPG), activador receptor de
15 ligando NF κ B (RANKL), osteocalcina e isoforma 5b de la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRACP).

49.- El producto de fármaco fabricado de conformidad con la reivindicación 47, caracterizado además porque las instrucciones comprenden
adicionalmente el uso recomendado de la formulación farmacéutica para
20 tratar pacientes que tienen un nivel anormal del biomarcador después de terapia previa con un fármaco antirreumático diferente.

50.- El producto de fármaco fabricado de conformidad con la reivindicación 47, caracterizado además porque las instrucciones comprenden

195

adicionalmente el uso recomendado de la formulación farmacéutica para tratar pacientes inflamatorios que no responden después de terapia previa con un fármaco antirreumático diferente.

51.- El producto de fármaco fabricado de conformidad con la reivindicación 43, caracterizado además porque el reumatismo inflamatorio es artritis reumatoide, el antagonista de IL-17A es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende una cadena ligera que tiene SEQ ID NO:1 y una cadena pesada que tiene SEQ ID NO:2, y el biomarcador de destrucción de articulaciones es RANKL, COMP u OPG.

52.- El uso de un antagonista de IL-17A para preparar un medicamento para tratar un paciente que tiene un reumatismo inflamatorio para inhibir destrucción de articulaciones, en donde el paciente tiene un nivel anormal de al menos un biomarcador de destrucción de articulaciones después de tratamiento previo con una terapia antirreumática diferente.

53.- El uso como el que se reclama en la reivindicación 52, en donde el biomarcador de destrucción de articulaciones se selecciona del grupo que consiste en proteína de matriz de oligómero en cartílago (COMP), telopéptido de entrelazamiento C-terminal de colágeno tipo I (CTX-I), telopéptido de entrelazamiento C-terminal de colágeno tipo II (CTX-II), glicoproteína-39 de cartílago humano (HC gp-39), osteoprotegrina (OPG), activador receptor de ligando NF κ B (RANKL), osteocalcina e isoforma 5b de la fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRACP).

196

54.- El uso como el que se reclama en la reivindicación 52, en donde el paciente es un paciente inflamatorio que no responde a la terapia antirreumática diferente.

5 55.- El uso como el que se reclama en la reivindicación 52, en donde el paciente es un paciente inflamatorio que responde a la terapia antirreumática diferente.

10 56.- El uso como el que se reclama en la reivindicación 52, en donde el antagonista de IL-17A es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende una cadena ligera que tiene SEQ ID NO:1 y una cadena pesada que tiene SEQ ID NO:2, y el biomarcador de destrucción de articulaciones es RANKL, COMP u OPG.

19/7

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describen novedosos métodos y productos de fármaco para tratar reumatismos inflamatorios tales como artritis reumatoide y artritis asociadas; los métodos y productos emplean diversos marcadores de suero de metabolismo o destrucción de hueso y cartílago, incluyendo proteína de matriz de oligómero en cartílago (COMP) y activador receptor de ligando NF κ B (RANKL), como biomarcadores para evaluar el efecto de antagonistas de IL-17A en destrucción de articulaciones en enfermedades articulares inflamatorias.

15

20

8A*9A*1A*3A*4A*todas

P09/1748F

198
✓

1/22

-----CDRL1-----
H₂N-DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC KSSQSLLFSENQKNYLA
WYLQKPGQSPQLLIY

-CDRL2- --CDRL3--
WTSTRQS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC QQSYYTPYT
FGQGTKVEIKR

human kappa constant light domain
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-cooh

Figure 1A

199

2/22

---CDRH1--

H₂N-QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVS GFSLPSHSVS WIRQPPGKGLEWIG

-----CDRH2-----

IIWNQGGTDYNSAFKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR

-----CDRH3-----

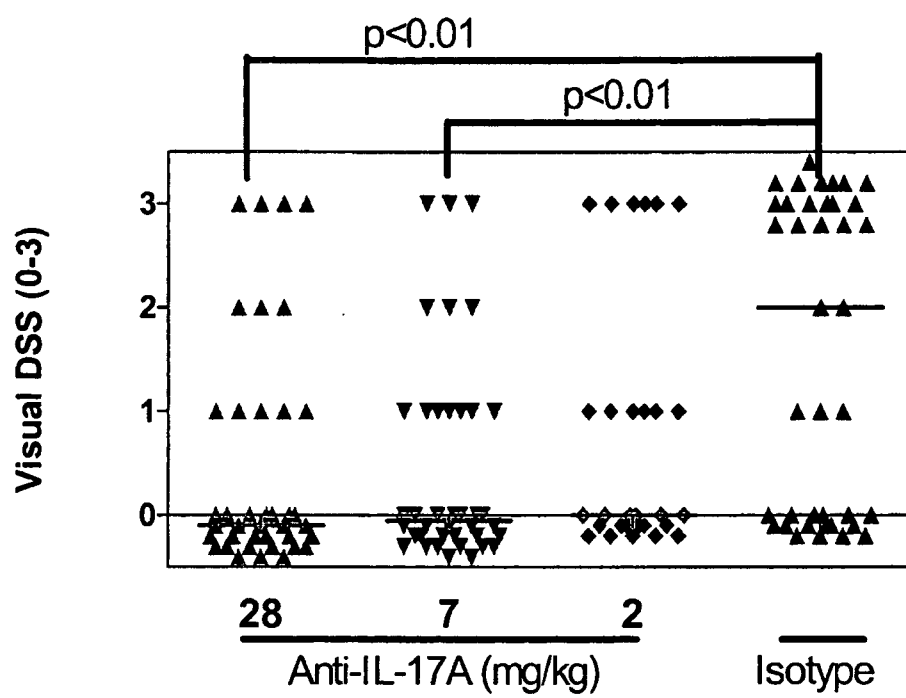
NAYITDYYYENYFMDA WGQGT LVTVSS

human IgG1 Fc (CH1-hinge-CH2-CH3)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK-cooh

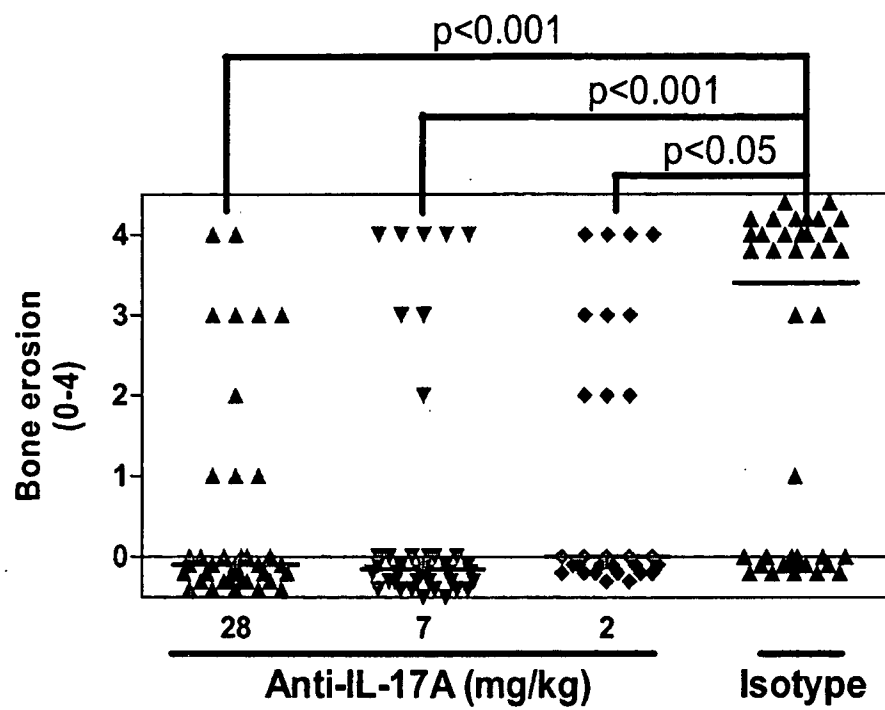
Figure 1B

3 / 22



202

5 / 22



6/22

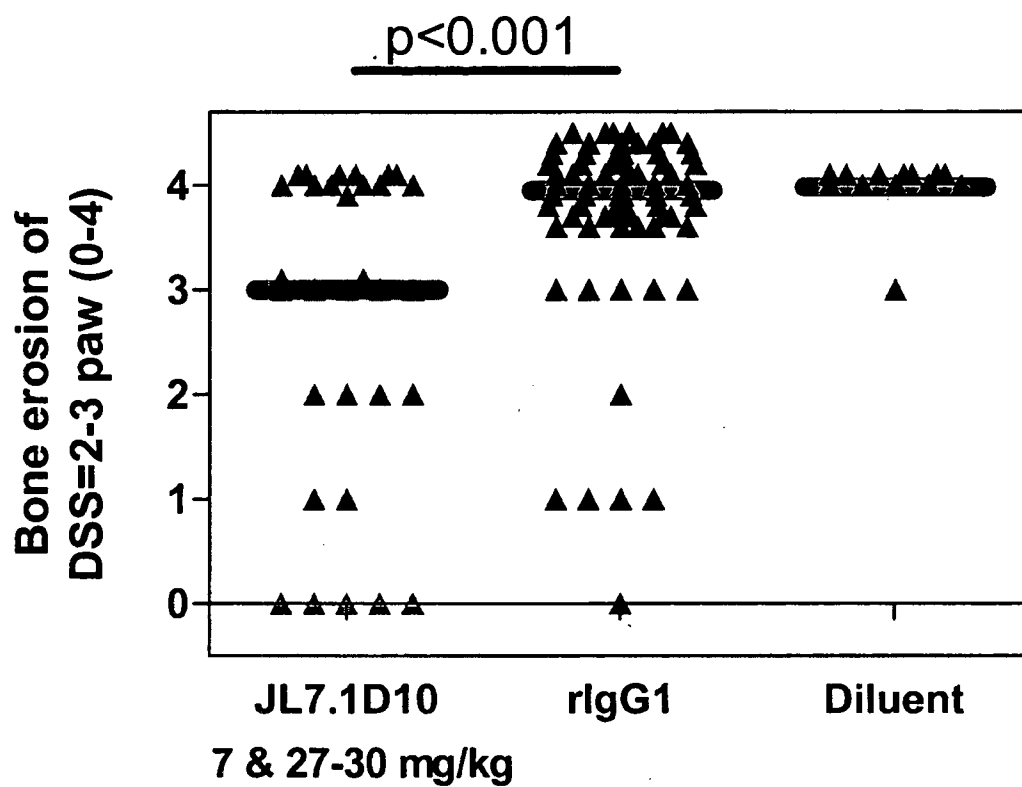


Figure 2D

209

7/22

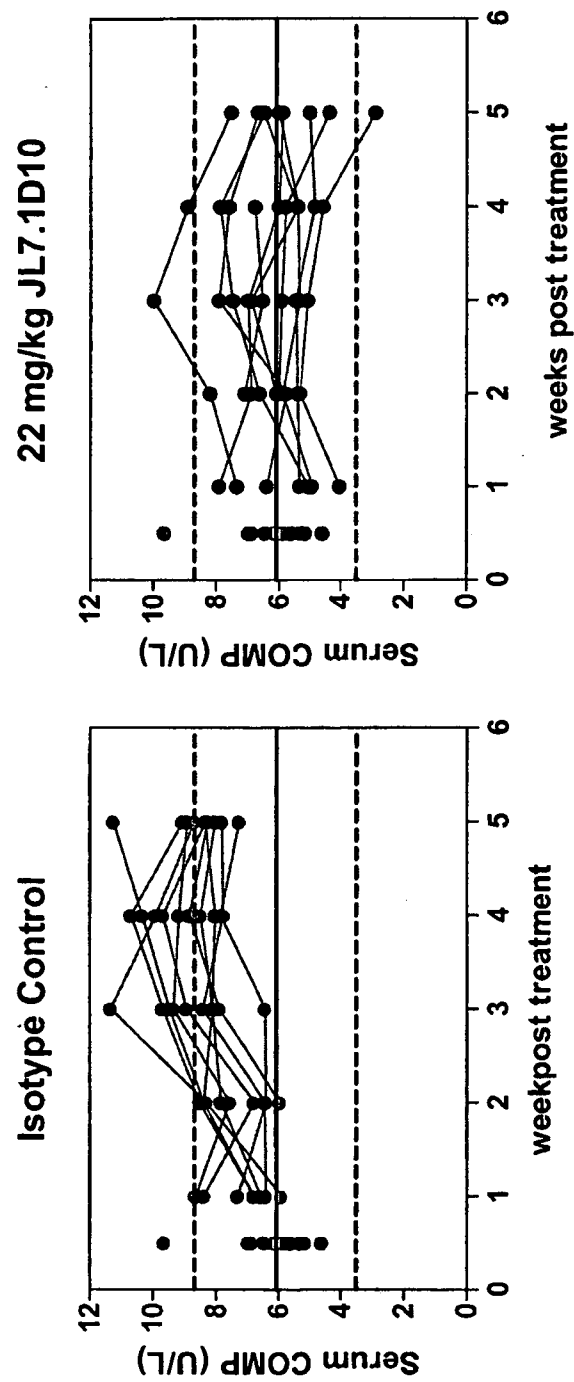


Figure 3A

205

8/22

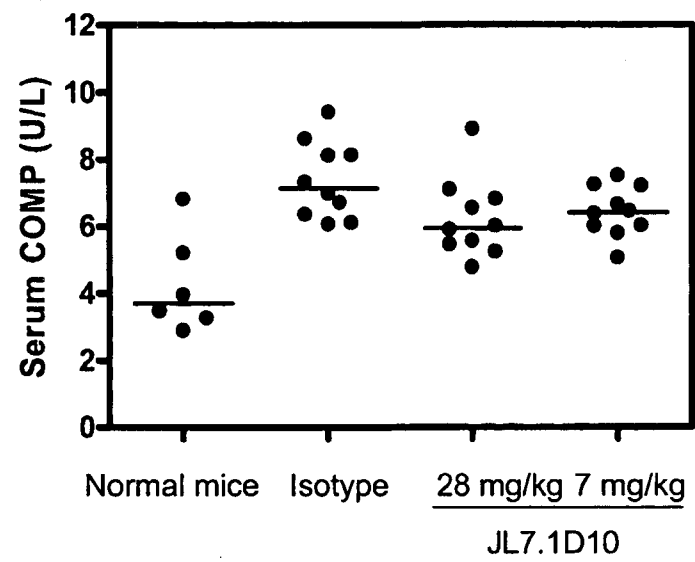


Figure 3AA



9 / 22

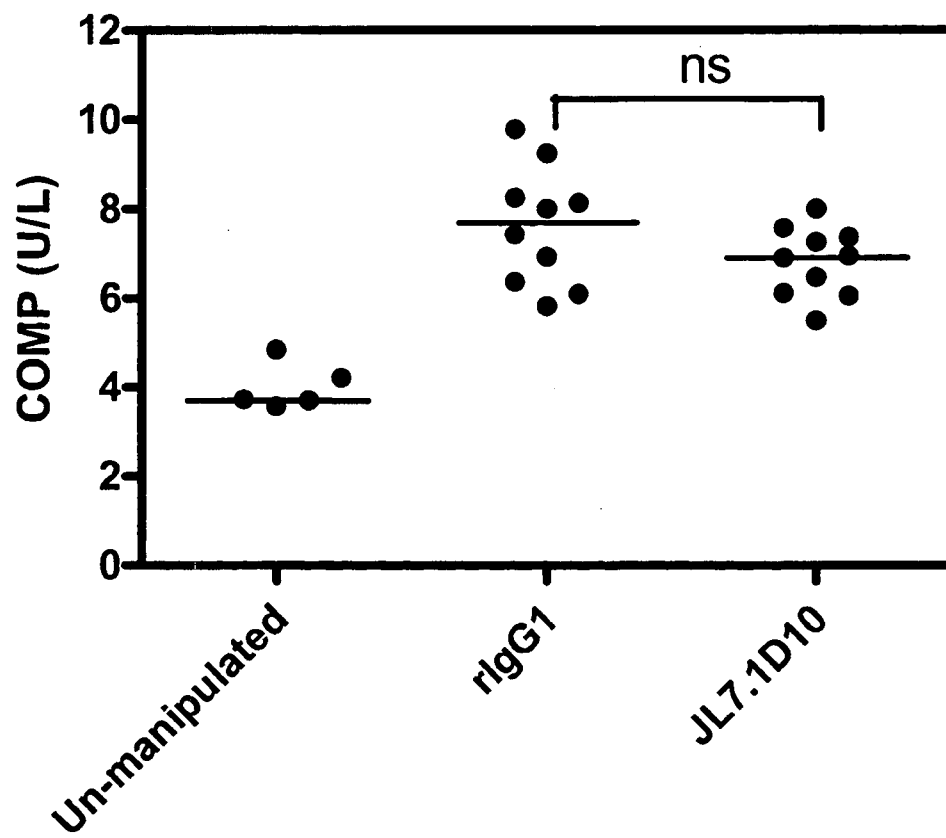


Figure 3B

207

10/22

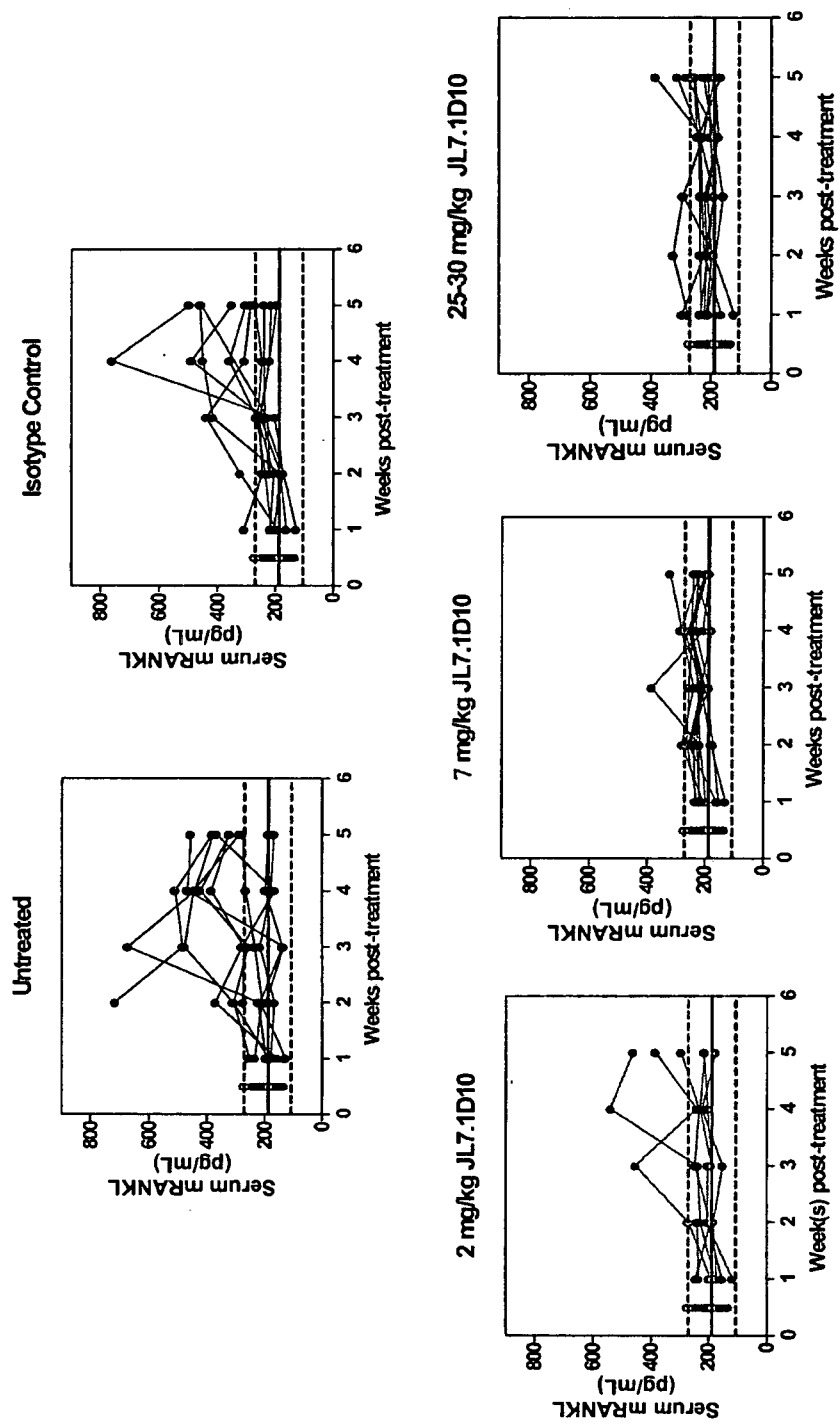


Figure 4

208

11/22

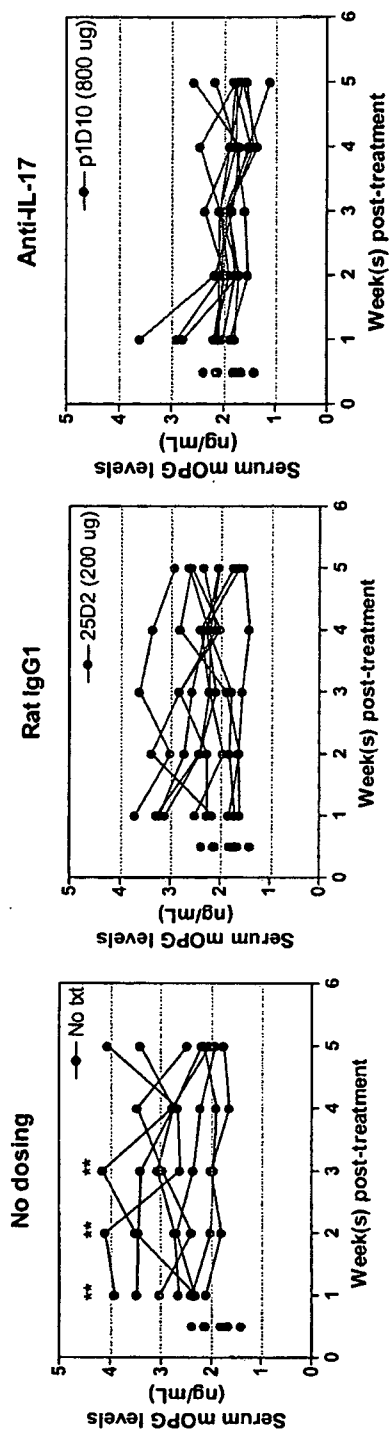


Figure 5

209

12/22

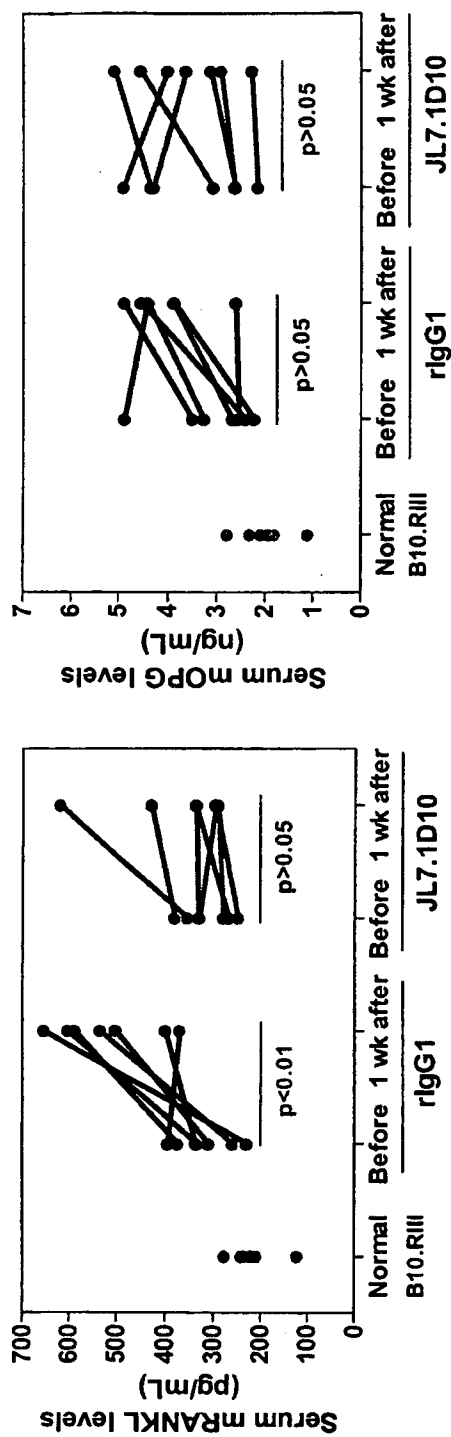


Figure 6

210

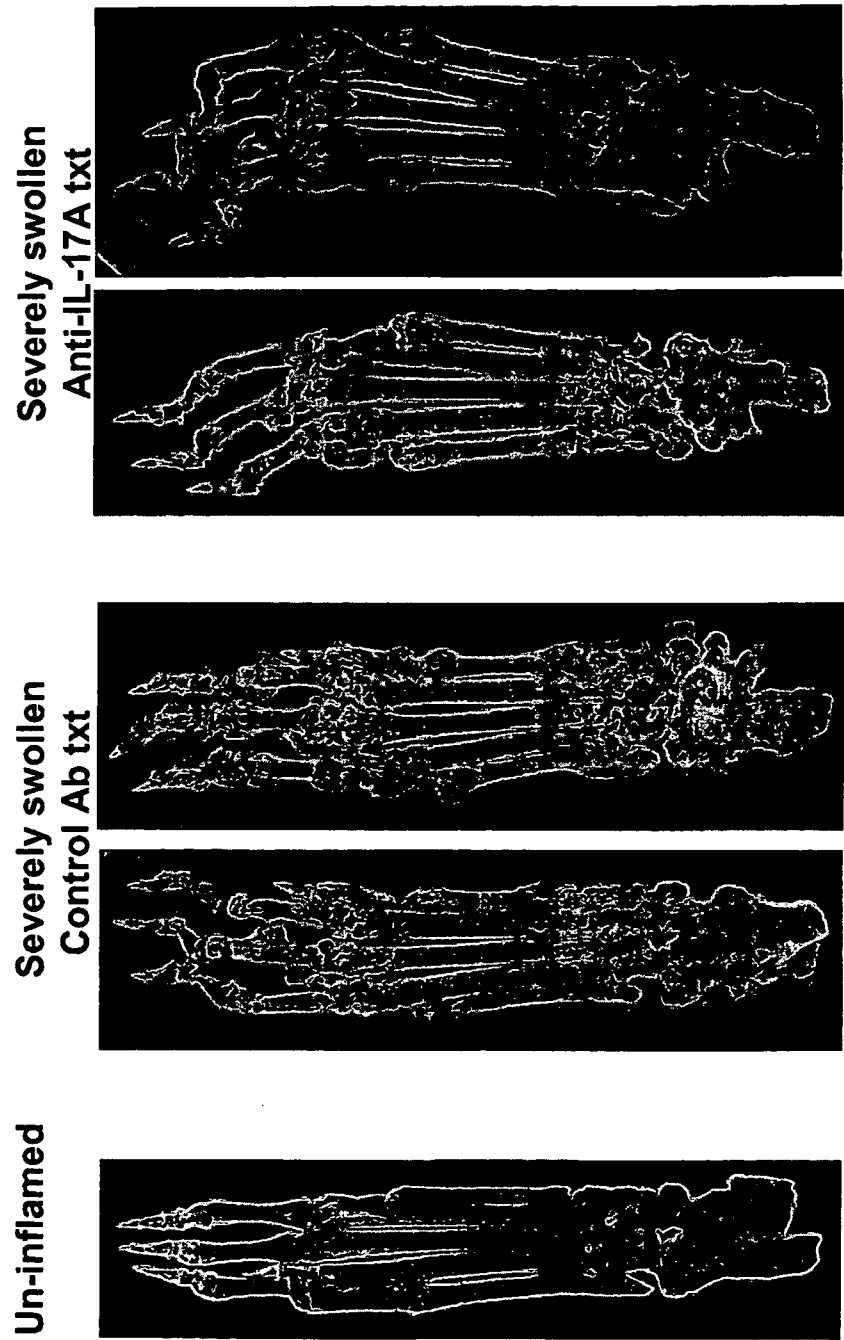


Figure 7

211

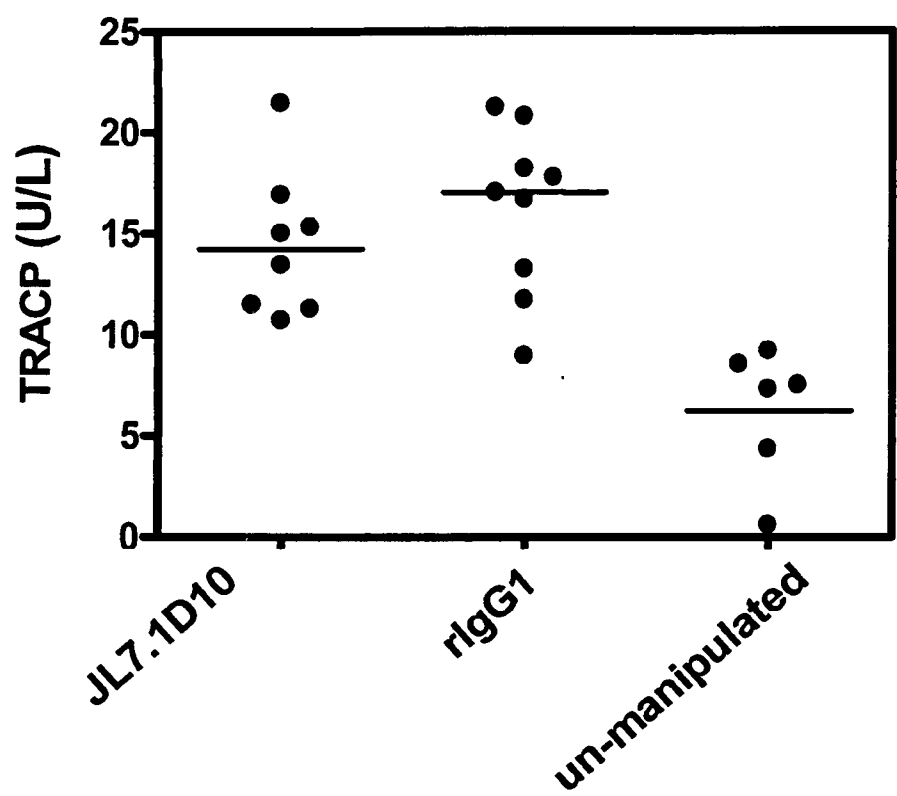


Figure 8

2/2

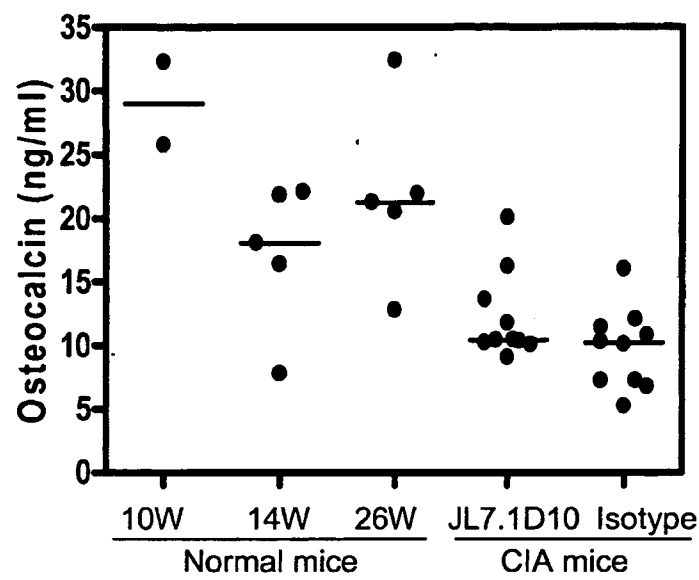


Figure 9

213

16/22

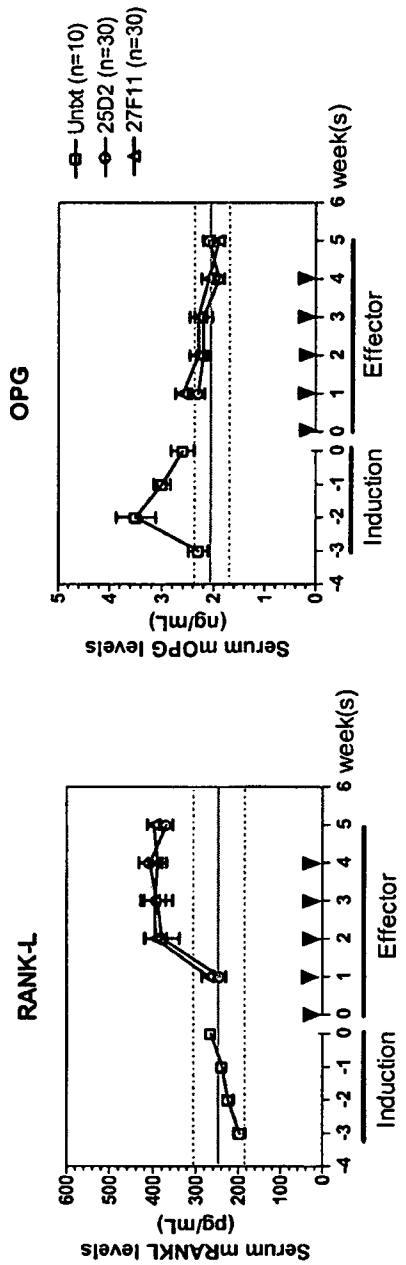


Figure 10

24

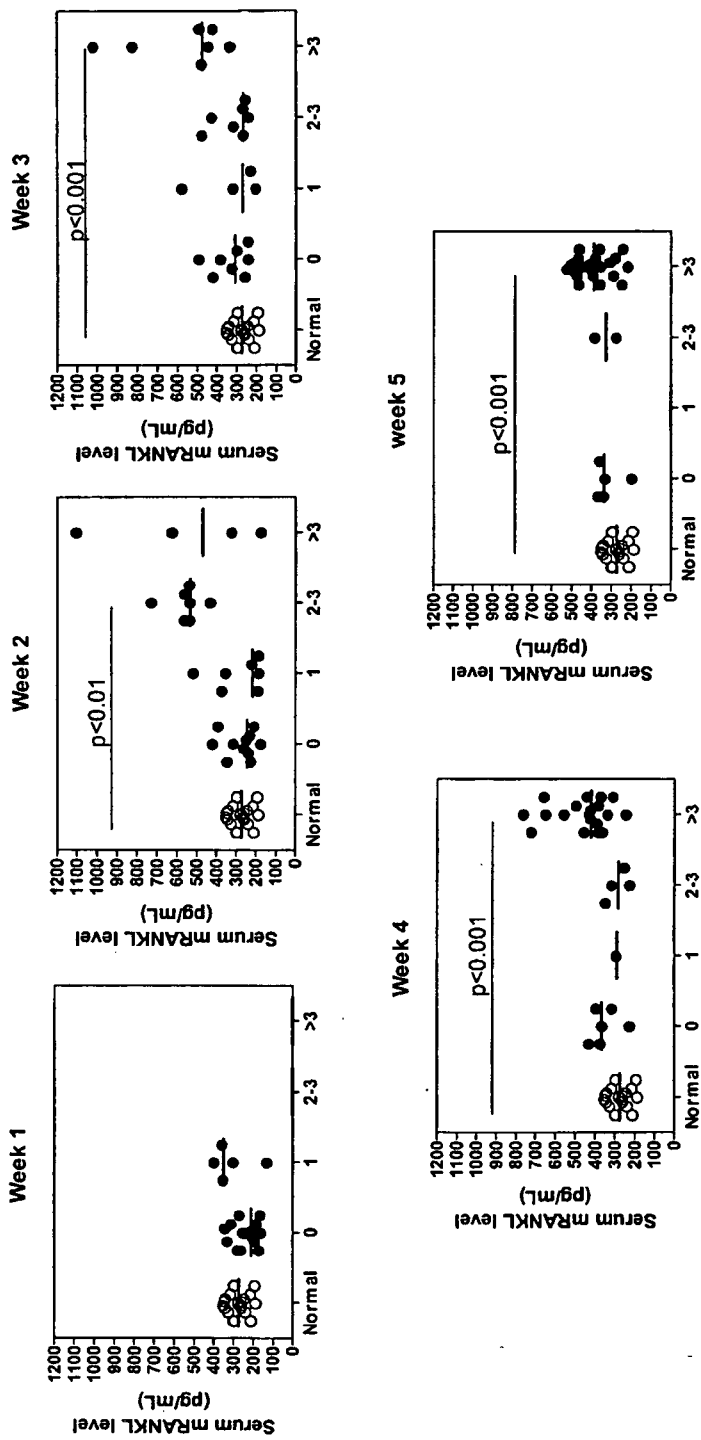


Figure 11

2/5

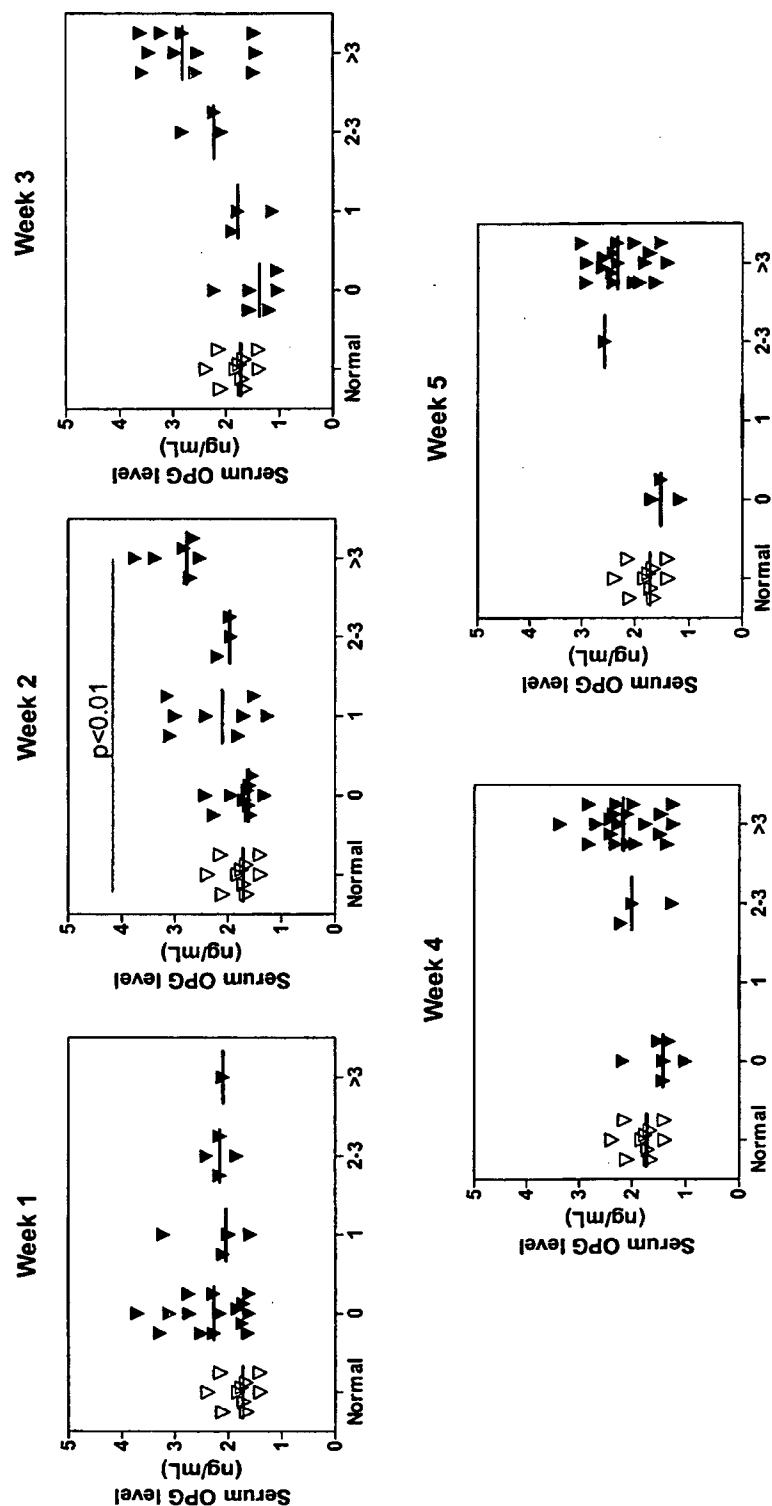


Figure 12

2/6

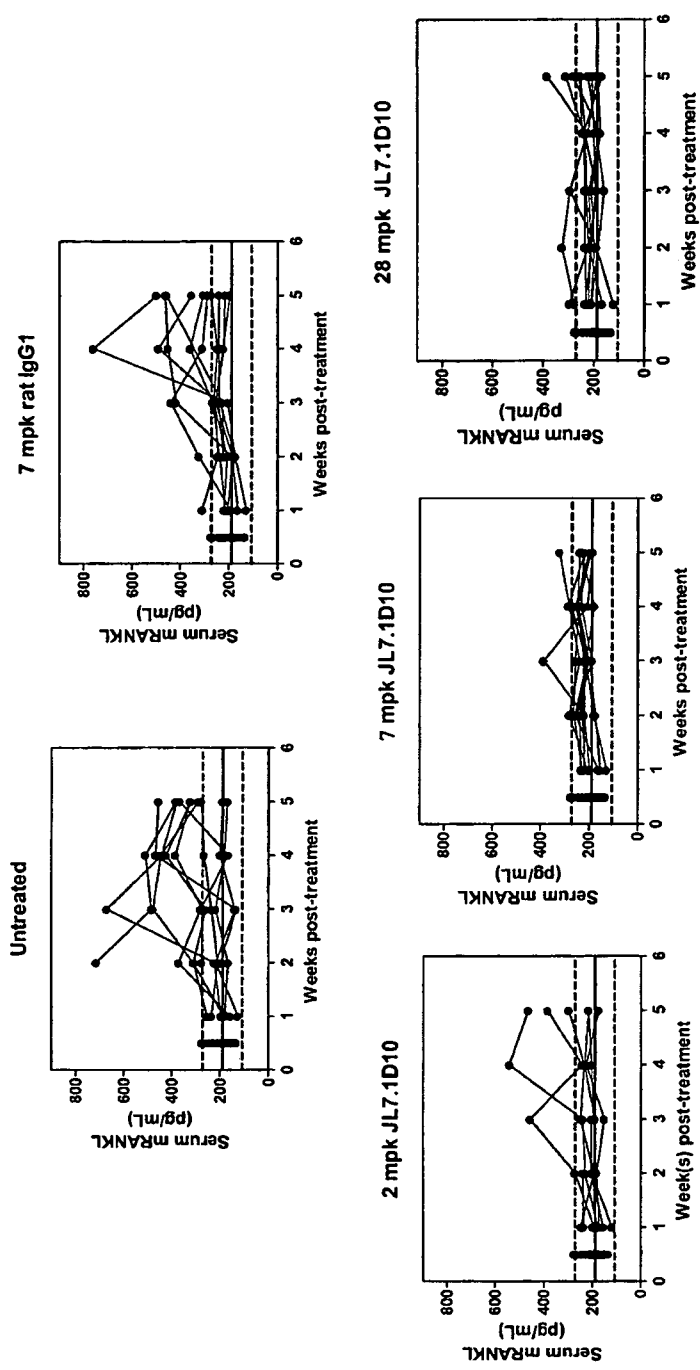


Figure 13

2/2

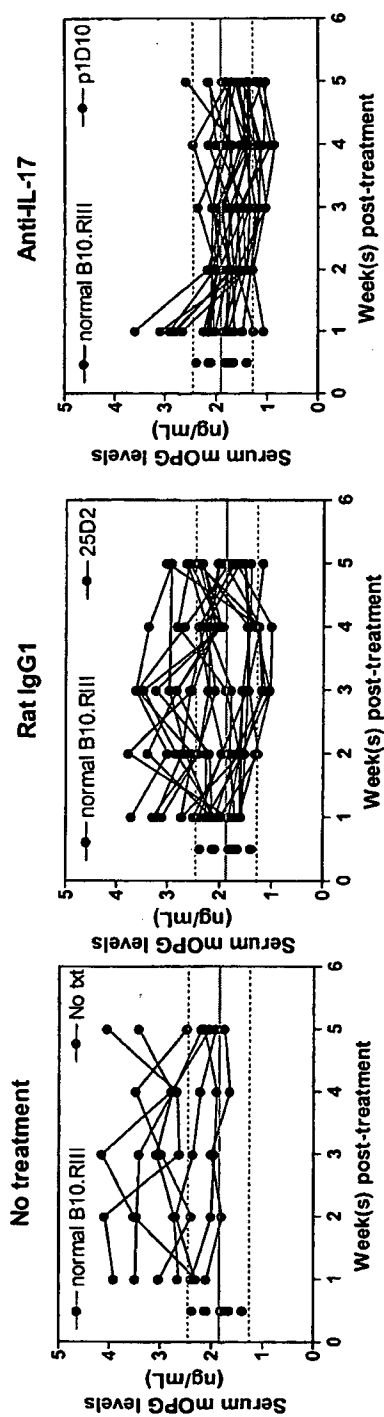


Figure 14

28

21/22

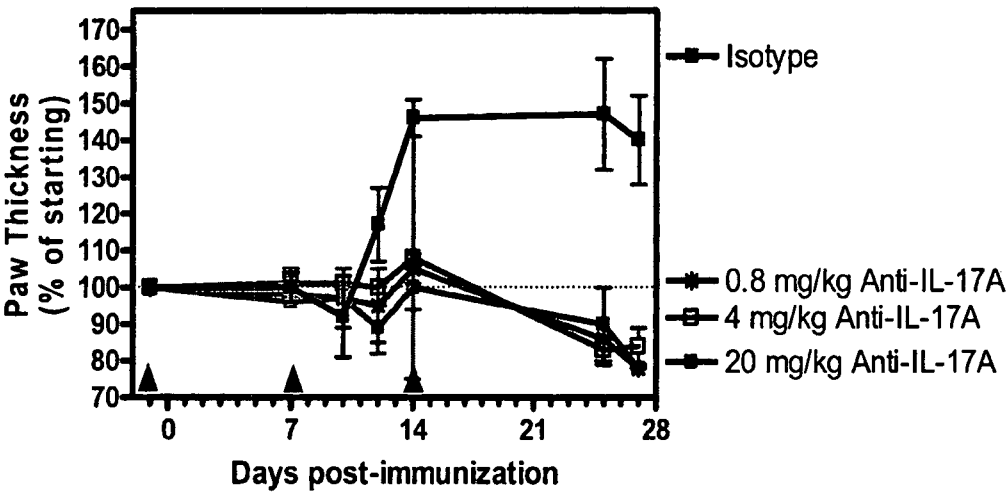


Figure 15

219

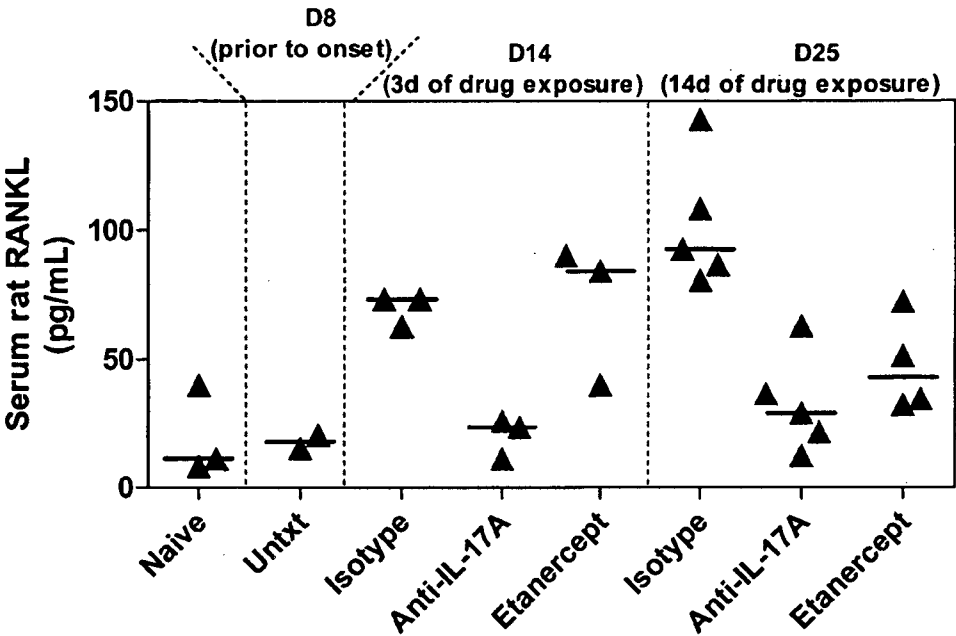


Figure 16

BP06679 Sequence Listing
SEQUENCE LISTING

20

<110> Bowman, Edward Paul
Chao, Cheng-Chi
Chen, Shi-Juan

<120> JOINT DESTRUCTION BIOMARKERS FOR ANTI-IL-17A THERAPY OF
INFLAMMATORY JOINT DISEASE

<130> BP06679

<140> To Be Assigned

<141> 2008-06-20

<150> 60/045,239

<151> 2007-06-20

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 220

<212> PRT

<213> Humanized Rat Antibody

<400> 1

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Phe Ser
20 25 30

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

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Thr Ser Thr Arg Gln Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Ser Tyr Tyr Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

195

BP06679 Sequence Listing
200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 2
<211> 454
<212> PRT
<213> Humanized Rat Antibody

<400> 2

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Pro Ser His
20 25 30

Ser Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ile Ile Trp Asn Gln Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Phe Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asn Ala Tyr Ile Thr Asp Tyr Tyr Tyr Glu Asn Tyr Phe Met Asp
100 105 110

Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255

BP06679 Sequence Listing

22

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 December 2008 (24.12.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/156865 A3

(51) International Patent Classification:
G01N 33/50 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/007770

(22) International Filing Date: 20 June 2008 (20.06.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/945,239 20 June 2007 (20.06.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **SCHERING CORPORATION** [US/US]; 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ 07033-0530 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BOWMAN, Edward, Paul** [US/US]; 1633 Alameda de las Pulgas, Redwood City, CA 94061 (US). **CHAO, Cheng-chi** [US/US]; 1205 Bretmoor Way, San Jose, CA 95129 (US). **CHEN, Shi-Juan** [US/US]; 5048 Campion Drive, San Ramon, CA 94582 (US).

(74) Agent: **HENDERSON, Melodie, W.**; Schering Corporation, Patent Department, K-6-1 1990, 2000 Galloping Hill Road, Kenilworth, NJ 07033-0530 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

(88) Date of publication of the international search report:
12 March 2009

(54) Title: JOINT DESTRUCTION BIOMARKERS FOR ANTI-IL-17A THERAPY OF INFLAMMATORY JOINT DISEASE

(57) Abstract: Novel methods and drug products for treating inflammatory joint diseases such as rheumatoid arthritis and associated arthritides are disclosed. The methods and products employ various serum markers of bone and cartilage metabolism or destruction, including cartilage oligomer matrix protein (COMP) and Receptor activator of NFB ligand (RANKL), as biomarkers to assess the effect of IL-17A antagonists on joint destruction in inflammatory joint diseases.

WO 2008/156865 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/007770A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, INSPEC, COMPENDEX, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/38764 A (UNIV CALIFORNIA [US]; HAUDENSCHILD DOMINIK [US]; ROSE LARRY [US]; MOSE) 16 May 2002 (2002-05-16) paragraphs [0005] - [0028]; claims 1,17,37-39,78-86	1-14
X	WO 2006/088833 A (WYETH CORP [US]; CARRENO BEATRIZ M [US]; COLLINS MARY [US]; WRIGHT JIL) 24 August 2006 (2006-08-24) paragraphs [0263] - [0276]; claims 47-73	1-14
X	WO 2006/037604 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT [DE]; U3 PHARMA AG [DE]; STUEHMER WALTER [DE];) 13 April 2006 (2006-04-13) sequence 26	14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 October 2008

Date of mailing of the international search report

03/02/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stachowiak, Olaf

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/007770

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/120557 A (IMCLONE SYSTEMS INC [US]; PEREIRA DANIEL [US]) 22 December 2005 (2005-12-22) sequence 27 -----	14
P,X	US 2007/196371 A1 (KUESTNER ROLF E [US] ET AL) 23 August 2007 (2007-08-23) examples 25-30 -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/007770

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-14

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-14

Methods for selecting patients suffering from inflammatory joint disease for treatment with an IL-17A antagonist, comprising determination of the level of at least one joint destruction biomarker.

2. claims: 15-33

Methods for predicting the efficacy of an IL-17A antagonist in inhibiting bone erosion in a subject suffering from inflammatory joint diseases comprising the determination of the level of at least one joint destruction biomarker.

3. claims: 34-56

Methods and kits for treating a subject having inflammatory joint disease with an IL-17A antagonist comprising determination of the level of at least one joint destruction biomarker. Use of IL-17A antagonists for the preparation of medicaments.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/007770

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0238764	A	16-05-2002	AU 2571402 A	21-05-2002
WO 2006088833	A	24-08-2006	AR 052289 A1	07-03-2007
			AU 2006214473 A1	24-08-2006
			CA 2596509 A1	24-08-2006
			EP 1848743 A2	31-10-2007
			JP 2008532936 T	21-08-2008
			KR 20070107703 A	07-11-2007
			NO 20074053 B	31-10-2007
WO 2006037604	A	13-04-2006	AU 2005291486 A1	13-04-2006
			CA 2582683 A1	13-04-2006
			JP 2008520186 T	19-06-2008
WO 2005120557	A	22-12-2005	CA 2566647 A1	22-12-2005
			EP 1773881 A2	18-04-2007
			JP 2008508858 T	27-03-2008
US 2007196371	A1	23-08-2007	AU 2007300393 A1	03-04-2008
			CA 2638819 A1	03-04-2008
			EP 1987058 A1	05-11-2008
			WO 2008039553 A1	03-04-2008

229

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-144823- -00000-0000

Fecha: 2009-12-17 16:57:41 Dep: 2020 DIR NUEVASOR
Tra: 11 PATENTEIYII Lve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 228



LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patenté.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐



Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
SCHERING CORPORATION

REFERENCIA	Radicación No.	9 144823
	Solicitud internacional	PCT/US2008/007770
	Fecha inicio fase nacional	20/01/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	Nº 018441

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 12 FEB. 2010
adpall

Al contestar favor indique el número de radicación consignado en el rótulo

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int.2. Tel 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia



Bogotá,
2020

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

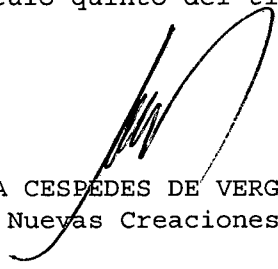
Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
SCHERING CORPORATION

REFERENCIA	Radicación No.	9 144823
	Solicitud internacional	PCT/US2008/007770
	Fecha inicio fase nacional	20/01/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	Nº 01845

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de quince reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 12 FEB. 2010
adpa11

Al contestar favor indique el número
de radicación consignado en el rótulo

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int.2. Tel 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia