



Libertad y Orden

REPUBLICA DE COLOMBIA
DIVISIÓN DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

PATENTE DE INVENCION

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

07-10436

TITULO ANTICUERPOS ANTAGONISTAS DE IL 17

SOLICITANTE NOVARTIS AG

DIRECCIÓN Lichtstrasse 35 CH-456 Basel, Suiza

APODERADO CARLOS R. OLARTE

BOGOTA, 02 DE FEBREO. 2007

OLARTERAIS

22/01
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-010438- -00000-0000
Fec 2007-02-02 18:47:17 Dep. 2020 NUECREACIONES
Trib. 11 PATENTE IYI
Eje. 379 FASE NACIONAL II
Act 411 PRESENTACION Folios: 209


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: NOVARTIS AG

Dirección: Lichtstrasse 35, CH-456 Basel

Nacionalidad o Domicilio: Sulza

Lugar de Constitución: Sulza

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
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 79782747Bta
TP 74.295

**INVENTOR (ES)
(72)**

Nombre: VER PÁGINA ADJUNTA

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2005/008470

Fecha Agosto 4, 2005

Publicación Internacional No. WO 2006/013107

Fecha Febrero 9, 2006

6

Título (54) ANTICUERPOS ANTAGONISTAS DE IL-17

Clasificación Internacional (51) A61K 39/395; A61P 29/09; C07K 16/24

Prioridad

SI

☒

N

☐

(33) País de Origen

GB

(32) Fecha

Agosto 4, 2004

(31) Número de Solicitud

0417487.6

9

Comprobante de pago No. 07-6.220

Fecha Enero 22, 2007

o

ANEXOS

x

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.

x

Poderes, si fuere el caso. (Adjunto copia símples ver expediente No. 06-076.505.)

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

Declaraciones.

x

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

x

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.

x

Otros. Búsqueda Internacional

1

FIGURA CARACTERÍSTICA:

2

Solicito la concesión de la patente,

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

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

LISTA DE INVENTORES PCT/EP2005/008470

1. FRANCO E. DI PADOVA
Kluenenfeldstrasse 45,
CH-4127 Birsfelden
Suiza.
Nacionalidad: Italiana

2. HERMANN GRAM
Am Bischofsacker 20,
79576 Weil am Rhein
Alemania.
Nacionalidad: Alemana

3. HANS HOFSTETTER
Chrischonaweg 92,
CH-4125 Riehen
Suiza.
Nacionalidad: Suiza

4. MARGIT JESCHKE
Grenzacher Str. 10,
CH-4058 Basel
Suiza.
Nacionalidad: Alemana

5. JEAN-MICHEL RONDEAU
2, Impasse du Pressoir,
F-68170 Rixheim
Francia.
Nacionalidad: Francesa

6. WIM VAN DEN BERG
Ridderlaan 12,
NL-6584 CB Molenhoek.
Países Bajos.
Nacionalidad: Países Bajos

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-010436-00000-0000
Fec: 2007-02-02 15:47:17 Dep. 2000 NUECREACIONES
Tol. 11 PATENTERYII
Ere: 379 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folio: 205

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176009-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 6,220
FECHA : ENERO 22 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISDEGR	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	57477382	22/01/2007	3,869,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

TRADUCCIÓN OFICIAL DE UN DOCUMENTO QUE ESTÁ ORIGINALMENTE EN INGLÉS

Nota del traductor:

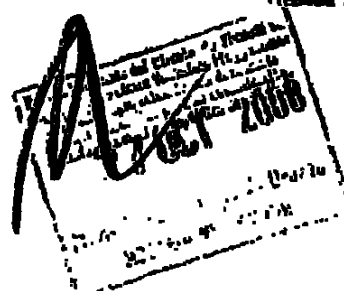
El documento adjunto de poder de Novartis AG a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana Maria Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro lleva los siguientes datos en inglés.

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

1. En esta fecha, día 30 de Agosto de 2006, yo, el suscrito Notario Público certifico por medio del presente la autenticidad de las firmas del señor Arthur Canonica, ciudadano de Corticiasca, Suiza, residente en Wisen/SO, Suiza, y del Sr. Pascal Traub, ciudadano de Riehen, Suiza, residente en Basilea, Suiza, ambos personas mayores de edad y con dirección comercial en Lichstrasse 35, 4056, Basilea, Suiza. La autenticidad de la firmas fue establecida por medio de la comparación.
2. Además, yo, el Notario Público, certifico por el presente que las anteriores personas han ejecutado el anterior documento como apoderados de Novartis AG.
3. Además, yo, el Notario Público certifico por el presente que Novartis AG, con su principal lugar de negocios en Basilea, Suiza, está debidamente constituida, está actualmente vigente y que los propósitos para los cuales se otorgó el Documento de Poder están dentro del alcance de sus propósitos corporativos.



Traductor Oficial
JORGE L. SIERRA REYES
Licencia 376-1993 Ministerio



4. Además, yo, el Notario Público, certifico por el presente que las anteriores personas tienen la autoridad para ejecutar el documento de Poder y que por este instrumento, su representación es legal.

La base para mis certificaciones de los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los siguientes documentos auténticos:

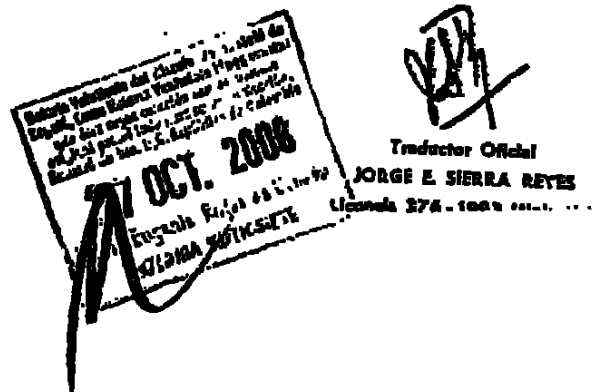
- Documento de Poder de Novartis AG fechado el 19 de junio de 2006 y
- Extracto del Registro de Comercio del Cantón de la ciudad de Basilea para Novartis AG, en Basilea, fechado el 25 de enero de 2006.

Basilea, Suiza, este día 30 de Agosto de 2006.

(Firmado) Dr. Matthias Staehelin, Notario Público del Cantón de la ciudad de Basilea, Suiza.

Mi licencia vence el 11 de Marzo de 2009.

Hay una Apostilla de Suiza, firmada por Heidi Fischer, bajo el No. 8049/13584.



Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto: "Novartis."

Fecha: 12 de Septiembre de 2006.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá, Colombia.

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.

E-mail: treseser1@yahoo.com. No. 8346



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Ministerio.

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Zeyla Chabín
Jacqueline Chaparro
José Luis Londoño
Felipe Mendoza
Simón Salinas

Of Counsel
Guillermo Chabín
Graziela Melo

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

NOVARTIS AG

domiciled in

domiciliado en

Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel / Switzerland

by means of these presents hereby grants to Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right 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, recourses, 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.

por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Letras Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual 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, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistír 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:

Date/Fecha: June 27, 2006

City/Country/Ciudad,País: Basel, Switzerland

Arthur Canonica

Pascal Threlb

World Trade Center - Torre A, Calle 100 No. 8A - 37, Piso 10, Bogotá D.C.
Tel + 57 1 601-7700, Fax + 57 1 601-7799, office@olarteraisbeck.com, www.olarteraisbeck.com



Attestation

- 1 On this date, the 30th (thirtieth) day of August 2006 (two thousand and six), I, the undersigned Notary Public certify herewith the authenticity of the signatures of Mr. **Arthur Canonica**, citizen of Corticiasca, Switzerland, residing in Wisen/SO, Switzerland and of **Mr. Pascal Traub**, citizen of Riehen, Switzerland, residing in Basel, Switzerland, both of legal age and with business address at, Lichtstrasse 35, 4056 Basel, Switzerland. The authenticity of the signatures was established by means of comparison.
- 2 Further, I, the Notary Public certify herewith that the foregoing persons have executed the foregoing document as proxy holders for Novartis AG.
- 3 Further, I, the Notary Public certify herewith that Novartis AG, having its principal place of business located in Basel / Switzerland, 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 Further, I, the Notary Public certify herewith that the foregoing persons have the authority to execute the Power of Attorney and that for this instrument their representation is legal.

The foundation for my certifications contained in points 2 (two), 3 (three) and 4 (four) was the exhibition of the following authentic documents:

- Power of Attorney by Novartis AG dated June 19 (nineteen), 2006 (two thousand and six); and
- Extract from the Register of Commerce of the Canton of Basel-City for Novartis AG, in Basel, dated January 25 (twenty-five), 2006 (two thousand and six).

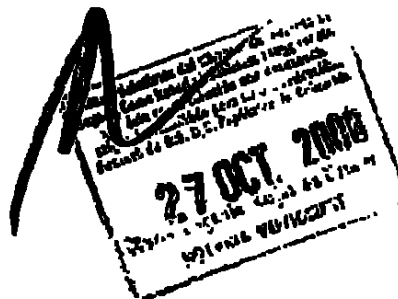
BASEL, Switzerland, this 30th (thirtieth) day of August 2006 (two thousand and six)

M. Staehelin

Dr. Matthias Staehelin, Notary Public
in the Canton of Basel-City, Switzerland

My license expires on March 11 (eleven),
2009 (two thousand and nine).

Leg.Prof.Nr. 975/2006



APOSTILLE

(Hague Convention of October 5th, 1954)

1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse)

This official document

2. is signed by Heidi Fischer

3. in his/her function as Director

4. and certified by the seal of the Basel-Stadt

Certified Basel-Stadt

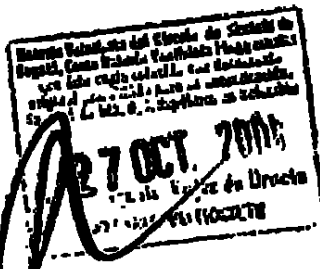
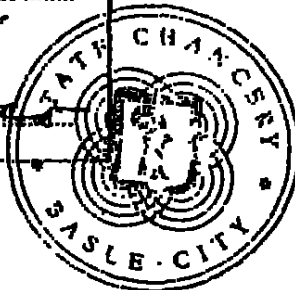
5. in Basel (Basle) 6. on 27 OCT 2011

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8. no. P.0451-18654

9. Seal/stamp: 10. Signature: Heidi Fischer

Heidi Fischer



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
9 February 2006 (09.02.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/013107 A1

(51) International Patent Classification: A61K 39/395,
A61P 29/00 // C07K 16/24

(FR). VAN DEN BERG, Wim [NL/NL]; Ridderlaan 12,
NL-6584 CB Molenhoek (NL).

(21) International Application Number:
PCT/EP2005/008470

(74) Agent: HILLEBRAND, Dirk; Novartis AG, Corporate
Intellectual Property, CH-4002 Basel (CH).

(22) International Filing Date: 4 August 2005 (04.08.2005)

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

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0417487.6 5 August 2004 (05.08.2004) GB

(71) Applicant (for all designated States except AT, US): NO-
VARTIS AG [CH/CH]; Lichtstrasse 35, CH-4056 Basel
(CH).

(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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (for AT only): NOVARTIS PHARMA GMBH
[AT/AT]; Brunner Strasse 59, A-1230 Vienna (AT).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DI PADOVA,
Franco, E. [IT/CH]; Klusenfeldstrasse 45, CH-4127
Birsfelden (CH). GRAM, Hermann [DE/DE]; Am
Bischofsacker 20, 79576 Weil am Rhein (DE). HOF-
STETTER, Hans [CH/CH]; Chrischonaweg 92, CH-4125
Riehen (CH). JESCHKE, Margit [DE/CH]; Grenzacher
Str. 10, CH-4058 Basel (CH). RONDEAU, Jean-Michel
[FR/FR]; 2, Impasse du Pressoir, F-68170 Rixheim

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: IL-17 ANTAGONISTIC ANTIBODIES

(57) Abstract: An IL-17 binding molecule, in particular an antibody to human IL-17, more preferably a human antibody to IL-17 is provided, wherein the hypervariable regions of the heavy and light chains have amino acid sequences as defined, for use in the treatment of an IL-17 mediated disease or disorder, e.g. rheumatoid arthritis.

WO 2006/013107 A1

IL-17 antagonistic antibodies

This invention relates to an IL-17 binding molecule, in particular an antibody to human IL-17, more preferably a human antibody to human IL-17 (also named IL-17A) and to the use of such antibodies in the treatment of IL-17 mediated diseases and disorders.

IL-17, a T-cell derived cytokine present e.g. in rheumatoid arthritis (RA), acts as a pro-inflammatory cytokine, particularly in conjunction with IL-1 and TNF- α (Chabaud M & Miossec P (1999) *Arthritis Rheum* 42, 963-970; Awane M et al (1999) *J. Immunol* 162, 5337-5344). IL-17 induces MMP production and downregulates TIMP (Jovanovic DV et al (2001) *J. Rheumatol.* 28, 712-718), and blockage of IL-1 and IL-17 has a synergistic effect on inflammation and bone destruction in vivo (Chabaud M & Miossec (2001) *Arthritis Rheum* 44, 1293-1303). Inappropriate or excessive production of IL-17 is associated with the pathology of various diseases and disorders, such as rheumatoid arthritis (Witowski et al., 2004 *Cell Mol Life Sci* 61:567-579), osteoarthritis, loosening of bone implants, acute transplant rejection (Antonyammy et al., 1999, *J Immunol* 162, 577-584; van Kooten et al., 1998, *J Am Soc Nephrol* 9, 1526-1534), septicemia, septic or endotoxic shock, allergies, asthma (Molet et al., 2001, *J Allergy Clin Immunol* 108, 430-438), bone loss, psoriasis (Teunissen et al., 1998, *J Invest Dermatol* 111, 645-649), ischemia, systemic sclerosis (Kurasawa et al., 2000, *Arthritis Rheum* 43, 2455-2463), stroke, and other inflammatory disorders. Antibodies to IL-17 have been proposed for use in the treatment of IL-17 mediated diseases and disorders; see for instance, WO 95/18826 and the discussion in the introduction thereof.

We have now prepared improved antibodies to human IL-17 suitable for use in the treatment of IL-17 mediated diseases and disorders.

Accordingly the invention provides an IL-17 binding molecule which comprises an antigen binding site comprising at least one immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3, said CDR1 having the amino acid sequence SEQ ID NO: 1 (N-Y-W-M-N), said CDR2 having the amino acid sequence SEQ ID NO: 2 (A-I-N-Q-D-G-S-E-K-Y-Y-V-G-S-V-K-G), and said CDR3 having the

amino acid sequence SEQ ID NO: 3 (D-Y-Y-D-I-L-T-D-Y-Y-I-H-Y-W-Y-F-D-L); or direct CDR equivalents thereof.

Accordingly the invention also provides an IL-17 binding molecule comprising at least one immunoglobulin light chain variable domain (V_L) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1', CDR2' and CDR3', said CDR1' having the amino acid sequence SEQ ID NO: 4 (R-A-S-Q-S-V-S-S-S-Y-L-A), said CDR2' having the amino acid sequence SEQ ID NO: 5 (G-A-S-S-R-A-T) and said CDR3' having the amino acid sequence SEQ ID NO: 6 (Q-Q-Y-G-S-S-P-C-T) or direct CDR' equivalents thereof.

In another embodiment of the invention, the invention provides an IL-17 binding molecule which comprises an antigen binding site comprising at least one immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1-x, CDR2-x and CDR3-x, said CDR1-x having the amino acid sequence SEQ ID NO: 11 (G-F-T-F-S-N-Y-W-M-N), said CDR2-x having the amino acid sequence SEQ ID NO: 12 (A-I-N-Q-D-G-S-E-K-Y-Y), and said CDR3-x having the amino acid sequence SEQ ID NO: 13 (C-V-R-D-Y-Y-D-I-L-T-D-Y-Y-I-H-Y-W-Y-F-D-L-W-G); or direct CDR-x equivalents thereof.

Furthermore, the invention also provides an IL-17 binding molecule comprising both heavy (V_H) and light chain (V_L) variable domains; said IL-17 binding molecule comprises at least one antigen binding site comprising:

- a) an immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3, said CDR1 having the amino acid sequence SEQ ID NO:1, said CDR2 having the amino acid sequence SEQ ID NO:2, and said CDR3 having the amino acid sequence SEQ ID NO:3 or direct CDR equivalents thereof; and
- b) an immunoglobulin light chain variable domain (V_L) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1', CDR2' and CDR3', said CDR1' having the amino acid sequence SEQ ID NO:4, said CDR2' having the amino acid sequence SEQ ID NO:5, and said CDR3' having the amino acid sequence SEQ ID NO:6 or direct CDR' equivalents thereof.

Moreover, the invention also provides an IL-17 binding molecule comprising both heavy (V_H) and light chain (V_L) variable domains; said IL-17 binding molecule comprises at least one antigen binding site comprising:

- a) an immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1-x, CDR2-x and CDR3-x, said CDR1-x having the amino acid sequence SEQ ID NO:11, said CDR2-x having the amino acid sequence SEQ ID NO:12, and said CDR3-x having the amino acid sequence SEQ ID NO:13 or direct CDR-x equivalents thereof; and
- b) an immunoglobulin light chain variable domain (V_L) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1', CDR2' and CDR3', said CDR1' having the amino acid sequence SEQ ID NO:4, said CDR2' having the amino acid sequence SEQ ID NO:5, and said CDR3' having the amino acid sequence SEQ ID NO:6 or direct CDR' equivalents thereof.

Unless otherwise indicated, any polypeptide chain is herein described as having an amino acid sequence starting at the N-terminal extremity and ending at the C-terminal extremity. When the antigen binding site comprises both the V_H and V_L domains, these may be located on the same polypeptide molecule or, preferably, each domain may be on a different chain, the V_H domain being part of an immunoglobulin heavy chain or fragment thereof and the V_L being part of an immunoglobulin light chain or fragment thereof.

By "IL-17 binding molecule" is meant any molecule capable of binding to the IL-17 antigen either alone or associated with other molecules. The binding reaction may be shown by standard methods (qualitative assays) including, for example, a binding assay, competition assay or a bioassay for determining the inhibition of IL-17 binding to its receptor or any kind of binding assays, with reference to a negative control test in which an antibody of unrelated specificity but of the same isotype, e.g. an anti-CD25 antibody, is used (see also Example 1).

Examples of antigen binding molecules include antibodies as produced by B-cells or hybridomas and chimeric, CDR-grafted or human antibodies or any fragment thereof, e.g. $F(ab')_2$ and Fab fragments, as well as single chain or single domain antibodies.

A single chain antibody consists of the variable domains of the heavy and light chains of an antibody covalently bound by a peptide linker usually consisting of from 10 to 30 amino acids, preferably from 15 to 25 amino acids. Therefore, such a structure does not include the constant part of the heavy and light chains and it is believed that the small peptide spacer should be less antigenic than a whole constant part. By "chimeric antibody" is meant an antibody in which the constant regions of heavy or light chains or both are of human origin while the variable domains of both heavy and light chains are of non-human (e.g. murine) origin or of human origin but derived from a different human antibody. By "CDR-grafted antibody" is meant an antibody in which the hypervariable regions (CDRs) are derived from a donor antibody, such as a non-human (e.g. murine) antibody or a different human antibody, while all or substantially all the other parts of the immunoglobulin e.g. the constant regions and the highly conserved parts of the variable domains, i.e. the framework regions, are derived from an acceptor antibody, e.g. an antibody of human origin. A CDR-grafted antibody may however contain a few amino acids of the donor sequence in the framework regions, for instance in the parts of the framework regions adjacent to the hypervariable regions. By "human antibody" is meant an antibody in which the constant and variable regions of both the heavy and light chains are all of human origin, or substantially identical to sequences of human origin, not necessarily from the same antibody and includes antibodies produced by mice in which the murine immunoglobulin variable and constant part genes have been replaced by their human counterparts, e.g. as described in general terms in EP 0546073 B1, USP 5545806, USP 5569825, USP 5625126, USP 5633425, USP 5661016, USP 5770429, EP 0 438474 B1 and EP 0 463151 B1.

Particularly preferred IL-17 binding molecules of the invention are human antibodies, especially the AIN457 antibody as hereinafter described in Examples 1 and 2.

Thus in preferred chimeric antibodies the variable domains of both heavy and light chains are of human origin, for instance those of the AIN457 antibody which are shown in SEQ ID NO: 10 (= variable domain of light chain, i.e. amino acid 1 to 109 of SEQ ID NO: 10) and SEQ ID NO: 8 (= variable domain of heavy chain, i.e. amino acid 1 to 127 of SEQ ID NO: 8). The constant region domains preferably also comprise suitable human constant region domains, for instance as described in "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat E.A. et al, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health.

Hypervariable regions may be associated with any kind of framework regions, though preferably are of human origin. Suitable framework regions are described in Kabat E.A. et al, *ibid*. The preferred heavy chain framework is a human heavy chain framework, for instance that of the AIN457 antibody. It consists in sequence e.g. of FR1 (amino acid 1 to 30 of SEQ ID NO: 8), FR2 (amino acid 36 to 49 of SEQ ID NO: 8), FR3 (amino acid 67 to 98 of SEQ ID NO: 8) and FR4 (amino acid 117 to 127 of SEQ ID NO: 8) regions. Taking into consideration the determined hypervariable regions of AIN457 by X-ray analysis, another preferred heavy chain framework consists in sequence of FR1-x (amino acid 1 to 25 of SEQ ID NO: 8), FR2-x (amino acid 36 to 49 of SEQ ID NO: 8), FR3-x (amino acid 61 to 95 of SEQ ID NO: 8) and FR4 (amino acid 119 to 127 of SEQ ID NO: 8) regions. In a similar manner, the light chain framework consists, in sequence, of FR1' (amino acid 1 to 23 of SEQ ID NO: 10), FR2' (amino acid 36 to 50 of SEQ ID NO: 10), FR3' (amino acid 58 to 89 of SEQ ID NO: 10) and FR4' (amino acid 99 to 109 of SEQ ID NO: 10) regions.

Accordingly, the invention also provides an IL-17 binding molecule which comprises at least one antigen binding site comprising either a first domain having an amino acid sequence substantially identical to that shown in SEQ ID NO: 8 starting with the amino acid at position 1 and ending with the amino acid at position 127 or a first domain as described above and a second domain having an amino acid sequence substantially identical to that shown in SEQ ID NO: 10, starting with the amino acid at position 1 and ending with the amino acid at position 109.

Monoclonal antibodies raised against a protein naturally found in all humans are typically developed in a non-human system e.g. in mice, and as such are typically non-human proteins. As a direct consequence of this, a xenogenic antibody as produced by a hybridoma, when administered to humans, elicits an undesirable immune response which is predominantly mediated by the constant part of the xenogenic immunoglobulin. This clearly limits the use of such antibodies as they cannot be administered over a prolonged period of time. Therefore it is particularly preferred to use single chain, single domain, chimeric, CDR-grafted, or especially human antibodies which are not likely to elicit a substantial allogenic response when administered to humans.

In view of the foregoing, a more preferred IL-17 binding molecule of the invention is selected from a human anti IL-17 antibody which comprises at least

- 12
17
- a) an immunoglobulin heavy chain or fragment thereof which comprises (i) a variable domain comprising in sequence the hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3 or direct CDR equivalents thereof and (ii) the constant part or fragment thereof of a human heavy chain; said CDR1 having the amino acid sequence SEQ ID NO: 1, said CDR2 having the amino acid sequence SEQ ID NO: 2, and said CDR3 having the amino acid sequence SEQ ID NO: 3; and
- b) an immunoglobulin light chain or fragment thereof which comprises (i) a variable domain comprising in sequence the hypervariable regions and optionally also the CDR1', CDR2', and CDR3' hypervariable regions or direct CDR' equivalents thereof and (ii) the constant part or fragment thereof of a human light chain, said CDR1' having the amino acid sequence SEQ ID NO: 4, said CDR2' having the amino acid sequence SEQ ID NO: 5, and said CDR3' having the amino acid sequence SEQ ID NO: 6.

Alternatively, an IL-17 binding molecule of the invention may be selected from a single chain binding molecule which comprises an antigen binding site comprising

- a) a first domain comprising in sequence the hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3 or direct CDR equivalents thereof, said CDR1 having the amino acid sequence SEQ ID NO: 1, said CDR2 having the amino acid sequence SEQ ID NO: 2, and said CDR3 having the amino acid sequence SEQ ID NO: 3; and
- b) a second domain comprising the hypervariable regions CDR1', CDR2' and CDR3' or direct CDR' equivalents thereof, said CDR1' having the amino acid sequence SEQ ID NO: 4, said CDR2' having the amino acid sequence SEQ ID NO: 5, and said CDR3' having the amino acid sequence SEQ ID NO: 6; and
- c) a peptide linker which is bound either to the N-terminal extremity of the first domain and to the C-terminal extremity of the second domain or to the C-terminal extremity of the first domain and to the N-terminal extremity of the second domain.

As it is well known, minor changes in an amino acid sequence such as deletion, addition or substitution of one, a few or even several amino acids may lead to an allelic form of the original protein which has substantially identical properties.

Thus, by the term "direct CDR equivalents thereof" are meant IL-17 binding molecules comprising in sequence the hypervariable regions CDR1_i, CDR2_i, and CDR3_i, (instead of CDR1, CDR2, and CDR3), wherein

- (i) the hypervariable region CDR1_i differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region CDR1 as shown in SEQ ID NO: 1; and
- (ii) the hypervariable region CDR2_i differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region CDR2 as shown in SEQ ID NO: 2; and
- (iii) the hypervariable region CDR3_i differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region CDR3 as shown in SEQ ID NO: 3; and
- (iv) such a molecule comprising in sequence the hypervariable regions CDR1_i, CDR2_i and CDR3_i is capable of inhibiting the activity of 1 nM (= 30ng/ml) human IL-17 at a concentration of 50 nM, preferably 20nM, more preferably 10 nM, more preferably 5 nM of said molecule by 50%, said inhibitory activity is measured on IL-6 production induced by hu-IL-17 in human dermal fibroblasts.

Similarly, by the term "direct CDR-x equivalents thereof" are meant IL-17 binding molecules comprising in sequence the hypervariable regions CDR1_{1-x}, CDR2_{1-x}, and CDR3_{1-x}, (instead of CDR1-x, CDR2-x, and CDR3-x), wherein

- (v) the hypervariable region CDR1_{1-x} differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region CDR1-x as shown in SEQ ID NO: 11; and
- (vi) the hypervariable region CDR2_{1-x} differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region CDR2-x as shown in SEQ ID NO: 12; and
- (vii) the hypervariable region CDR3_{1-x} differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region CDR3-x as shown in SEQ ID NO: 13; and
- (viii) such a molecule comprising in sequence the hypervariable regions CDR1_{1-x}, CDR2_{1-x}, and CDR3_{1-x} is capable of inhibiting the activity of 1 nM (= 30ng/ml) human IL-17 at a concentration of 50 nM, preferably 20nM, more preferably 10 nM, more preferably 5 nM of said molecule by 50%, said inhibitory activity is measured on IL-6 production induced by hu-IL-17 in human dermal fibroblasts.

Similarly, by the term "direct CDR' equivalents thereof" is meant a domain comprising in sequence the hypervariable regions CDR1'_i, CDR2'_i, and CDR3'_i, wherein

- (i) the hypervariable region CDR1'; differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region CDR1' as shown in SEQ ID NO: 4; and
- (ii) the hypervariable region CDR2'; differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region CDR2' as shown in SEQ ID NO: 5; and
- (iii) the hypervariable region CDR3'; differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region CDR3' as shown in SEQ ID NO: 6; and
- (iv) such a molecule comprising in sequence the hypervariable regions CDR1', CDR2', and CDR3'; is capable of inhibiting the activity of 1 nM (= 30ng/ml) human IL-17 at a concentration of 50 nM, preferably 20nM, more preferably 10 nM, more preferably 5 nM of said molecule by 50%, said inhibitory activity is measured on IL-6 production induced by hu-IL-17 in human dermal fibroblasts.

Alternatively, an IL-17 binding molecule of the invention may be an IL-17 binding molecule which comprises at least one antigen binding site comprising at least one immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) which comprises in sequence

a) hypervariable regions CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 2) and CDR3 (SEQ ID NO: 3); or

b) hypervariable regions CDR1_i, CDR2_i, CDR3_i, said hypervariable region CDR1_i differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR1 as shown in SEQ ID NO: 1, said hypervariable region CDR2_i differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR2 as shown in SEQ ID NO: 2; and said hypervariable region CDR3_i differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR3 as shown in SEQ ID NO: 3; and

said binding IL-17 molecule comprising in sequence the hypervariable regions CDR1_x, CDR2_x, and CDR3_x is capable of inhibiting the activity of 1 nM (= 30ng/ml) human IL-17 at a concentration of 50 nM, preferably 20nM, more preferably 10 nM, more preferably 5 nM of said molecule by 50%, said inhibitory activity is measured on IL-6 production induced by hu-IL-17 in human dermal fibroblasts.

Similarly, an IL-17 binding molecule of the invention may be an IL-17 binding molecule which comprises at least one antigen binding site comprising at least one immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) which comprises in sequence

a) hypervariable regions CDR1-x (SEQ ID NO: 11), CDR2-x (SEQ ID NO: 12) and CDR3-x

(SEQ ID NO: 13); or

b) hypervariable regions CDR1_{1-x}, CDR2_{1-x}, CDR3_{1-x}, said hypervariable region CDR1_{1-x} differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR1-x as shown in SEQ ID NO: 11, said hypervariable region CDR2_{1-x} differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR2-x as shown in SEQ ID NO: 12; and said hypervariable region CDR3_{1-x} differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR3-x as shown in SEQ ID NO: 13; and said binding IL-17 molecule comprising in sequence the hypervariable regions CDR1_{1-x}, CDR2_{1-x} and CDR3_{1-x} is capable of inhibiting the activity of 1 nM (= 30ng/ml) human IL-17 at a concentration of 50 nM, preferably 20nM, more preferably 10 nM, more preferably 5 nM of said molecule by 50%, said inhibitory activity is measured on IL-6 production induced by hu-IL-17 in human dermal fibroblasts.

Similarly, an IL-17 binding molecule of the invention may be an IL-17 binding molecule which comprises at least one antigen binding site comprising at least one immunoglobulin light chain variable domain (V_L) which comprises in sequence

a) hypervariable regions CDR'1 (SEQ ID NO: 4), CDR'2 (SEQ ID NO: 5) and CDR'3 (SEQ ID NO: 6); or

b) hypervariable regions CDR'1_i, CDR'2_i, CDR'3_i, said hypervariable region CDR'1_i differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR'1 as shown in SEQ ID NO: 4, said hypervariable region CDR'2_i differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR'2 as shown in SEQ ID NO: 5; and said hypervariable region CDR'3_i differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR'3 as shown in SEQ ID NO: 6; and said binding IL-17 molecule comprises in sequence the hypervariable regions CDR'1_i, CDR'2_i and CDR'3_i is capable of inhibiting the activity of 1 nM (= 30ng/ml) human IL-17 at a concentration of 50 nM, preferably 20nM, more preferably 10 nM, more preferably 5 nM of said molecule by 50%, said inhibitory activity is measured on IL-6 production induced by hu-IL-17 in human dermal fibroblasts.

Alternatively, an IL-17 binding molecule of the invention may be a IL-17 binding molecule comprising both heavy (V_H) and light chain (V_L) variable domains and said IL-17 binding molecule comprises at least one antigen binding site comprising:

a) an immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1 (SEQ ID NO: 1), CDR2 (SEQ ID NO: 2) and CDR3 (SEQ ID NO: 3); and

an immunoglobulin light chain variable domain (V_L) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1' (SEQ ID NO: 4), CDR2' (SEQ ID NO: 5) and CDR3' (SEQ ID NO: 6); or

b) an immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1_h, CDR2_h, and CDR3_h, said hypervariable region hypervariable regions CDR1_h, CDR2_h, CDR3_h, said hypervariable region CDR1_h differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR1 as shown in SEQ ID NO: 1, said hypervariable region CDR2_h differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR2 as shown in SEQ ID NO: 2; and said hypervariable region CDR3_h differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR3 as shown in SEQ ID NO: 3; and

an immunoglobulin light chain variable domain (V_L) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1'_l, CDR2'_l, CDR3'_l, said hypervariable region CDR'1_l differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR'1 as shown in SEQ ID NO: 4, said hypervariable region CDR'2_l differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR'2 as shown in SEQ ID NO: 5; and said hypervariable region CDR'3_l differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR'3 as shown in SEQ ID NO: 6; and

said binding IL-17 molecule defined in b) comprises in sequence the hypervariable regions CDR1_h, CDR2_h, CDR3_h, CDR'1_l, CDR'2_l, and CDR'3_l; is capable of inhibiting the activity of 1 nM (= 30ng/ml) human IL-17 at a concentration of 50 nM, preferably 20nM, more preferably 10 nM, more preferably 5 nM of said molecule by 50%, said inhibitory activity is measured on IL-6 production induced by hu-IL-17 in human dermal fibroblasts.

Alternatively, an IL-17 binding molecule of the invention may be a IL-17 binding molecule comprising both heavy (V_H) and light chain (V_L) variable domains and said IL-17 binding molecule comprises at least one antigen binding site comprising:

a) an immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1-x (SEQ ID NO: 11), CDR2-x (SEQ ID NO: 12) and CDR3-x (SEQ ID NO: 13); and

22

an immunoglobulin light chain variable domain (V_L) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1' (SEQ ID NO: 4), CDR2' (SEQ ID NO: 5) and CDR3' (SEQ ID NO: 6); or

b) an immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1_H-x, CDR2_H-x, and CDR3_H-x, said hypervariable region hypervariable regions CDR1_H-x, CDR2_H-x, CDR3_H-x, said hypervariable region CDR1_H-x differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR1-x as shown in SEQ ID NO: 11, said hypervariable region CDR2_H-x differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR2-x as shown in SEQ ID NO: 12; and said hypervariable region CDR3_H-x differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR3-x as shown in SEQ ID NO: 13; and

an immunoglobulin light chain variable domain (V_L) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1'₁, CDR2'₁, CDR3'₁, said hypervariable region CDR'₁ differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR'₁ as shown in SEQ ID NO: 4, said hypervariable region CDR'₂ differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR'₂ as shown in SEQ ID NO: 5; and said hypervariable region CDR'₃ differs by 3, preferably 2, more preferably 1 amino acid(s) from the hypervariable region of CDR'₃ as shown in SEQ ID NO: 6; and

said binding IL-17 molecule defined in b) comprises in sequence the hypervariable regions CDR1₁, CDR2₁, CDR3₁, CDR'₁, CDR'₂, and CDR'₃, is capable of inhibiting the activity of 1 nM (= 30ng/ml) human IL-17 at a concentration of 50 nM, preferably 20nM, more preferably 10 nM, more preferably 5 nM of said molecule by 50%, said inhibitory activity is measured on IL-6 production induced by hu-IL-17 in human dermal fibroblasts.

The inhibition of the binding of IL-17 to its receptor may be conveniently tested in various assays including such assays are described hereinafter in the text. By the term "to the same extent" is meant that the reference and the equivalent molecules exhibit, on a statistical basis, essentially identical IL-17 inhibitory activity in one of the assays referred to herein (see Example 1). For example, IL-17 binding molecules of the invention typically have IC_{50} s for the inhibition of human IL-17 on IL-6 production induced by human IL-17 in human dermal fibroblasts which are within ± 5 , i.e. below 10 nM, more preferably 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 or 2 nM of that of, preferably substantially the same as, the IC_{50} of the corresponding reference molecule when assayed as described in Example 1.

Alternatively, the assay used may be an assay of competitive inhibition of binding of IL-17 by soluble IL-17 receptors (e.g. the human IL-17 R/Fc constructs of Example 1) and the IL-17 binding molecules of the invention.

Most preferably, the human IL-17 antibody comprises at least

- a) one heavy chain which comprises a variable domain having an amino acid sequence substantially identical to that shown in SEQ ID NO: 8 starting with the amino acid at position 1 and ending with the amino acid at position 127 and the constant part of a human heavy chain; and
- b) one light chain which comprises a variable domain having an amino acid sequence substantially identical to that shown in SEQ ID NO: 10 starting with the amino acid at position 1 and ending with the amino acid at position 109 and the constant part of a human light chain.

The constant part of a human heavy chain may be of the γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , μ , α_1 , α_2 , δ or ϵ type, preferably of the γ type, more preferably of the γ_1 type, whereas the constant part of a human light chain may be of the κ or λ type (which includes the λ_1 , λ_2 and λ_3 subtypes) but is preferably of the κ type. The amino acid sequences of all these constant parts are given in Kabat et al (*supra*).

Conjugates of the binding molecules of the invention, e. g. enzyme or toxin or radioisotope conjugates, are also included within the scope of the invention.

"Polypeptide", if not otherwise specified herein, includes any peptide or protein comprising amino acids joined to each other by peptide bonds, having an amino acid sequence starting at the N-terminal extremity and ending at the C-terminal extremity. Preferably the polypeptide of the present invention is a monoclonal antibody, more preferred is a chimeric (also called V-grafted) or humanised (also called CDR-grafted) monoclonal antibody, most preferred a fully human antibody obtainable e.g. by the technology exemplified in Example 1. The humanised (CDR-grafted) or fully human monoclonal antibody may or may not include further mutations introduced into the framework (FR) sequences of the acceptor antibody.

A functional derivative of a polypeptide as used herein includes a molecule having a qualitative biological activity in common with a polypeptide to the present invention, i.e. having the ability to bind to the human IL-17. A functional derivative includes fragments and peptide

analogs of a polypeptide according to the present invention. Fragments comprise regions within the sequence of a polypeptide according to the present invention, e.g. of a specified sequence. The term "derivative" is used to define amino acid sequence variants, and covalent modifications of a polypeptide according to the present invention, e.g. of a specified sequence. The functional derivatives of a polypeptide according to the present invention, e.g. of a specified sequence, e.g. of the hypervariable region of the light and the heavy chain, preferably have at least about 65%, more preferably at least about 75%, even more preferably at least about 85%, most preferably at least about 95, 96, 97, 98, 99% overall sequence homology with the amino acid sequence of a polypeptide according to the present invention, e.g. of a specified sequence, and substantially retain the ability to bind the human IL-17 or e.g. neutralize IL-6 production of IL-17 induced human dermal fibroblasts.

The term "covalent modification" includes modifications of a polypeptide according to the present invention, e.g. of a specified sequence; or a fragment thereof with an organic proteinaceous or non-proteinaceous derivatizing agent, fusions to heterologous polypeptide sequences, and post-translational modifications. Covalent modified polypeptides, e.g. of a specified sequence, still have the ability to bind the human IL-17 or e.g. neutralize IL-6 production of IL-17 induced human dermal fibroblasts by crosslinking. Covalent modifications are traditionally introduced by reacting targeted amino acid residues with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected sides or terminal residues, or by harnessing mechanisms of post-translational modifications that function in selected recombinant host cells. Certain post-translational modifications are the result of the action of recombinant host cells on the expressed polypeptide. Glutaminyl and asparaginyl residues are frequently post-translationally deamidated to the corresponding glutamyl and aspartyl residues. Alternatively, these residues are deaminated under mildly acidic conditions. Other post-translational modifications include hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl, tyrosine or threonyl residues, methylation of the α -amino groups of lysine, arginine, and histidine side chains, see e.g. T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983). Covalent modifications e.g. include fusion proteins comprising a polypeptide according to the present invention, e.g. of a specified sequence and their amino acid sequence variants, such as immunoadhesins, and N-terminal fusions to heterologous signal sequences.

"Homology" with respect to a native polypeptide and its functional derivative is defined herein as the percentage of amino acid residues in the candidate sequence that are identical with the residues of a corresponding native polypeptide, after aligning the sequences and introducing gaps,

if necessary, to achieve the maximum percent homology, and not considering any conservative substitutions as part of the sequence identity. Neither N- or C-terminal extensions nor insertions shall be construed as reducing identity or homology. Methods and computer programs for the alignment are well known.

"Amino acid(s)" refer to all naturally occurring L- α -amino acids, e.g. and including D-amino acids. The amino acids are identified by either the well known single-letter or three-letter designations.

The term "amino acid sequence variant" refers to molecules with some differences in their amino acid sequences as compared to a polypeptide according to the present invention, e.g. of a specified sequence. Amino acid sequence variants of a polypeptide according to the present invention, e.g. of a specified sequence, still have the ability to bind the human IL-17 or e.g. neutralize IL-6 production of IL-17 induced human dermal fibroblasts. Substitutional variants are those that have at least one amino acid residue removed and a different amino acid inserted in its place at the same position in a polypeptide according to the present invention, e.g. of a specified sequence. These substitutions may be single, where only one amino acid in the molecule has been substituted, or they may be multiple, where two or more amino acids have been substituted in the same molecule. Insertional variants are those with one or more amino acids inserted immediately adjacent to an amino acid at a particular position in a polypeptide according to the present invention, e.g. of a specified sequence. Immediately adjacent to an amino acid means connected to either the α -carboxy or α -amino functional group of the amino acid. Deletional variants are those with one or more amino acids in a polypeptide according to the present invention, e.g. of a specified sequence, removed. Ordinarily, deletional variants will have one or two amino acids deleted in a particular region of the molecule.

An IL-17 binding molecule of the invention may be produced by recombinant DNA techniques. In view of this, one or more DNA molecules encoding the binding molecule must be constructed, placed under appropriate control sequences and transferred into a suitable host organism for expression.

In a very general manner, there are accordingly provided

- (i) DNA molecules encoding a single domain IL-17 binding molecule of the invention, a single chain IL-17 binding molecule of the invention, an IL-17 binding molecule

- comprising a heavy and light chain as defined herein, or fragments of a IL-17 binding molecule of the invention; and
- (ii) the use of the DNA molecules of the invention for the production of a IL-17 binding molecule of the invention by recombinant means.

Accordingly, the invention provides a DNA molecule encoding an IL-17 binding molecule as described above.

Furthermore, the invention provides a DNA construct comprising a DNA molecule which is substantially homologous to SEQ ID NO: 7 or SEQ ID NO: 9.

Furthermore, the invention provides a DNA construct comprising two DNA molecules of which one is substantially homologous to SEQ ID NO: 7 or is a direct DNA_H equivalent thereof and the other substantially homologous to SEQ ID NO: 9, or is a direct DNA_L equivalent thereof.

The present state of the art is such that the skilled worker in the art is able to synthesize the DNA molecules of the invention given the information provided herein i.e. the amino acid sequences of the hypervariable regions and the DNA sequences coding for them. A method for constructing a variable domain gene is for example described in EPA 239 400 and may be briefly summarized as follows: A gene encoding a variable domain of a MAb of whatever specificity is cloned. The DNA segments encoding the framework and hypervariable regions are determined and the DNA segments encoding the hypervariable regions are removed so that the DNA segments encoding the framework regions are fused together with suitable restriction sites at the junctions. The restriction sites may be generated at the appropriate positions by mutagenesis of the DNA molecule by standard procedures. Double stranded synthetic CDR cassettes are prepared by DNA synthesis according to the sequences encoding for SEQ ID NO: 1 (CDR1), SEQ ID NO: 2 (CDR2), SEQ ID NO: 3 (CDR3), SEQ ID NO: 4 (CDR1'), SEQ ID NO: 5 (CDR2'), SEQ ID NO: 6 (CDR6'), SEQ ID NO: 11 (CDR1-x), SEQ ID NO: 12 (CDR2-x), SEQ ID NO: 13 (CDR3-x). These cassettes are provided with sticky ends so that they can be ligated at the junctions of the framework

Furthermore, it is not necessary to have access to the mRNA from a producing hybridoma cell line in order to obtain a DNA construct coding for the IL-17 binding molecules of the

invention. Thus PCT application WO 90/07861 gives full instructions for the production of an antibody by recombinant DNA techniques given only written information as to the nucleotide sequence of the gene. The method comprises the synthesis of a number of oligonucleotides, their amplification by the PCR method, and their splicing to give the desired DNA sequence.

Expression vectors comprising a suitable promoter or genes encoding heavy and light chain constant parts are publicly available. Thus, once a DNA molecule of the invention is prepared it may be conveniently transferred in an appropriate expression vector. DNA molecules encoding single chain antibodies may also be prepared by standard methods, for example, as described in WO 88/1649.

In analogy to the case for CDR equivalents, the term "direct DNA_H equivalents thereof" is meant to stand for a first DNA construct encoding a heavy chain or fragment thereof of an IL-17 binding molecule of the invention and comprises:

- a) a first part which encodes a variable domain comprising alternatively framework and hypervariable regions, said hypervariable regions being in sequence CDR1_i, CDR2_i and CDR3_i, said CDR1_i is at least 50% homologous, preferably at least 60, 70, 80, 85, or 90% homologous, more preferably at least 95% homologous to the hypervariable region CDR1 as shown in SEQ ID NO: 1, said CDR2_i is at least 50% homologous, preferably at least 60, 70, 80, 85, or 90% homologous, more preferably at least 95% homologous to the hypervariable region CDR2 as shown in SEQ ID NO: 2, and CDR3_i is at least 50% homologous, preferably at least 60, 70, 80, 85, or 90% homologous, more preferably at least 95% homologous to the hypervariable region CDR3 as shown in SEQ ID NO: 3; this first part starting with a codon encoding the first amino acid of the variable domain and ending with a codon encoding the last amino acid of the variable domain; and
- b) a second part encoding a heavy chain constant part or fragment thereof which starts with a codon encoding the first amino acid of the constant part of the heavy chain and ends with a codon encoding the last amino acid of the constant part or fragment thereof, followed by a stop codon; and
- c) said DNA construct encoding for a polypeptide which is capable either alone or in combination with another polypeptide of inhibiting the activity of 1 nM (= 30ng/ml) human IL-17 at a concentration of 50 nM, preferably 20nM, more preferably 10 nM, more preferably 5 nM of said molecule by 50%, said inhibitory activity is measured on IL-6 production induced by hu-

IL-17 in human dermal fibroblasts.

Similarly, the term "direct DNA_{H-x} equivalents thereof" is meant to stand for a first alternative DNA construct encoding a heavy chain or fragment thereof of an IL-17 binding molecule of the invention and comprises:

- a) a first part which encodes a variable domain comprising alternatively framework and hypervariable regions, said hypervariable regions being in sequence CDR1_{-x}, CDR2_{-x} and CDR3_{-x}, said CDR1_{-x} is at least 50% homologous, preferably at least 60, 70, 80, 85, or 90% homologous, more preferably at least 95% homologous to the hypervariable region CDR1 as shown in SEQ ID NO: 11, said CDR2_{-x} is at least 50% homologous, preferably at least 60, 70, 80, 85, or 90% homologous, more preferably at least 95% homologous to the hypervariable region CDR2 as shown in SEQ ID NO: 12, and CDR3_{-x} is at least 50% homologous, preferably at least 60, 70, 80, 85, or 90% homologous, more preferably at least 95% homologous to the hypervariable region CDR3 as shown in SEQ ID NO: 13; this first part starting with a codon encoding the first amino acid of the variable domain and ending with a codon encoding the last amino acid of the variable domain; and
- b) a second part encoding a heavy chain constant part or fragment thereof which starts with a codon encoding the first amino acid of the constant part of the heavy chain and ends with a codon encoding the last amino acid of the constant part or fragment thereof, followed by a stop codon; and
- c) said DNA construct encoding for a polypeptide which is capable either alone or in combination with another polypeptide of inhibiting the activity of 1 nM (= 30ng/ml) human IL-17 at a concentration of 50 nM, preferably 20nM, more preferably 10 nM, more preferably 5 nM of said molecule by 50%, said inhibitory activity is measured on IL-6 production induced by hu-IL-17 in human dermal fibroblasts.

Preferably, these DNA constructs encode a variable domain comprising alternatively framework and hypervariable regions, said hypervariable regions being in sequence CDR1, CDR2 and CDR3, said CDR1 having the amino acid sequence SEQ ID NO: 1, said CDR2 having the amino acid sequence SEQ ID NO: 2, and said CDR3 having the amino acid sequence SEQ ID NO: 3. More preferably, these DNA constructs encode a variable domain comprising alternatively framework and hypervariable regions, said hypervariable regions being in sequence CDR1-x, CDR2-x and CDR3-x, said CDR1-x having the amino acid sequence SEQ ID NO: 11,

said CDR2-x having the amino acid sequence SEQ ID NO: 12, and said CDR3-x having the amino acid sequence SEQ ID NO: 13. More preferably, this first part encodes a variable domain having an amino acid sequence substantially identical to the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 8 starting with the amino acid at position 1 and ending with the amino acid at position 127. More preferably the first part has the nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO: 7 starting with the nucleotide at position 1 and ending with the nucleotide at position 381. Also preferably, the second part encodes the constant part of a human heavy chain, more preferably the constant part of the human γ 1 chain. This second part may be a DNA fragment of genomic origin (comprising introns) or a cDNA fragment (without introns).

Similarly, the term "direct DNA_L equivalents thereof" is meant to stand for a second DNA construct encoding a light chain or fragment thereof of an IL-17 binding molecule of the invention and comprises:

- a) a first part which encodes a variable domain comprising alternatively framework and hypervariable regions; said hypervariable regions being CDR3_L' and optionally CDR1_L' and CDR2_L', said CDR1_L' is at least 50% homologous, preferably at least 60, 70, 80, 85, or 90% homologous, more preferably at least 95% homologous to the hypervariable region CDR1' as shown in SEQ ID NO: 4, said CDR2_L' is at least 50% homologous, preferably at least 60, 70, 80, 85, or 90% homologous, more preferably at least 95% homologous to the hypervariable region CDR2' as shown in SEQ ID NO: 5, and said CDR3_L' is at least 50% homologous, preferably at least 60, 70, 80, 85, or 90% homologous, more preferably at least 95% homologous to the hypervariable region CDR3' as shown in SEQ ID NO: 6; this first part starting with a codon encoding the first amino acid of the variable domain and ending with a codon encoding the last amino acid of the variable domain; and
- b) a second part encoding a light chain constant part or fragment thereof which starts with a codon encoding the first amino acid of the constant part of the light chain and ends with a codon encoding the last amino acid of the constant part or fragment thereof followed by a stop codon; and
- c) said DNA construct encoding for a polypeptide which is capable either alone or in combination with another polypeptide of inhibiting the activity of 1 nM (= 30ng/ml) human IL-17 at a concentration of 50 nM, preferably 20nM, more preferably 10 nM, more preferably 5 nM of said molecule by 50%, said inhibitory activity is measured on IL-6 production induced by hu-

IL-17 in human dermal fibroblasts.

Preferably, this second DNA construct encodes a variable domain comprising alternatively framework and hypervariable regions, said hypervariable regions being in sequence CDR1', CDR2' and CDR3', said CDR1' having the amino acid sequence SEQ ID NO: 4, said CDR2' having the amino acid sequence SEQ ID NO: 5, and said CDR3' having the amino acid sequence SEQ ID NO: 6. More preferably, this first part of the second DNA construct encodes a variable domain having an amino acid sequence substantially identical to the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 10 starting with the amino acid at position 1 and ending with the amino acid at position 109. More preferably, the first part has the nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO: 9 starting with the nucleotide at position 1 and ending with the nucleotide at position 327. Also preferably the second part encodes the constant part of a human light chain, more preferably the constant part of the human κ

Preferably, the first and second DNA construct will be used together, but may be also used separately.

The invention also includes IL-17 binding molecules in which one or more of the amino acid residues of CDR1, CDR2, CDR3, CDR1-x, CDR2-x, CDR3-x, CDR1', CDR2' or CDR3' or the frameworks, typically only a few (e.g. 1-4), are changed; for instance by mutation e.g. site directed mutagenesis of the corresponding DNA sequences. The invention includes the DNA sequences coding for such changed IL-17 binding molecules. In particular the invention includes IL-17 binding molecules in which one or more residues of CDR1' or CDR2' have been changed from the residues shown in SEQ ID NO: 4 (for CDR1') and SEQ ID NO: 5 (for CDR2').

In the first and second DNA constructs, the first and second parts may be separated by an intron, and, an enhancer may be conveniently located in the intron between the first and second parts. The presence of such an enhancer which is transcribed but not translated, may assist in efficient transcription. In particular embodiments the first and second DNA constructs comprise the enhancer of a heavy chain gene advantageously of human origin.

Each of the DNA constructs are placed under the control of suitable control sequences, in particular under the control of a suitable promoter. Any kind of promoter may be used, provided

that it is adapted to the host organism in which the DNA constructs will be transferred for expression.

31
31

The desired antibody may be produced in a cell culture or in a transgenic animal. A suitable transgenic animal may be obtained according to standard methods which include micro injecting into eggs the first and second DNA constructs placed under suitable control sequences transferring the so prepared eggs into appropriate pseudo-pregnant females and selecting a descendant expressing the desired antibody.

When the antibody chains are produced in a cell culture, the DNA constructs must first be inserted into either a single expression vector or into two separate but compatible expression vectors, the latter possibility being preferred.

Accordingly, the invention also provides an expression vector able to replicate in a prokaryotic or eukaryotic cell line which comprises at least one of the DNA constructs above described.

Each expression vector containing a DNA construct is then transferred into a suitable host organism. When the DNA constructs are separately inserted on two expression vectors, they may be transferred separately, i.e. one type of vector per cell, or co-transferred, this latter possibility being preferred. A suitable host organism may be a bacterium, a yeast or a mammalian cell line, this latter being preferred. More preferably, the mammalian cell line is of lymphoid origin, e.g. a myeloma, hybridoma or a normal immortalised B-cell, which conveniently does not express any endogenous antibody heavy or light chain.

For expression in mammalian cells it is preferred that the IL-17 binding molecule coding sequence is integrated into the host cell DNA within a locus which permits or favours high level expression of the IL-17 binding molecule. Cells in which the IL-17 binding molecule coding sequence is integrated into such favourable loci may be identified and selected on the basis of the levels of the IL-17 binding molecule which they express. Any suitable selectable marker may be used for preparation of host cells containing the IL-17 binding molecule coding sequence; for instance, a dhfr gene/methotrexate or equivalent selection system may be used. Alternative systems for expression of the IL-17 binding molecules of the invention include GS-based

amplification/selection systems, such as those described in EP 0256055 B, EP 0323997 B and European patent application 89303964.4.

In a further aspect of the invention there is provided a process for the product of an IL-17 binding molecule which comprises (i) culturing an organism which is transformed with an expression vector as defined above and (ii) recovering the IL-17 binding molecule from the culture.

For the purposes of the present description an antibody is "capable of inhibiting the binding of IL-17 as AIN457" if the antibody is capable of inhibiting the binding of IL-17 to its receptor substantially to the same extent as the AIN457 antibody, wherein "to the same extent" has meaning as defined above.

The AIN457 antibody has binding affinity for IL-17 which is higher than affinities previously reported for anti-IL-17 antibodies, in particular to any anti human IL-17 antibodies. Thus AIN457 has a dissociation equilibrium constant K_D for binding to IL-17 of about 0.188 ± 0.036 nM (determined by BIAcore, e.g. as shown in Example 2). This high binding affinity makes the AIN457 antibody particularly suitable for therapeutic applications.

In the present description the phrase "IL-17 mediated disease" encompasses all diseases and medical conditions in which IL-17 plays a role, whether directly or indirectly, in the disease or medical condition, including the causation, development, progress, persistence or pathology of the disease or condition.

In the present description the terms "treatment" or "treat" refer to both prophylactic or preventative treatment as well as curative or disease modifying treatment, including treatment of patient at risk of contracting the disease or suspected to have contracted the disease as well as patients who are ill or have been diagnosed as suffering from a disease or medical condition, and includes suppression of clinical relapse.

IL-17 binding molecules as defined above which have binding specificity for human IL-17, in particular antibodies which are capable of inhibiting the binding of IL-17 to its receptor, and antibodies to IL-17 which are capable of inhibiting the activity of 1 nM (= 30ng/ml) human

IL-17 at a concentration of 50 nM, preferably 20nM, more preferably 10 nM, more preferably 5 nM of said molecule by 50%, said inhibitory activity is measured on IL-6 production induced by hu-IL-17 in human dermal fibroblasts, are herein referred to as Antibodies of the Invention.

Preferably the Antibodies of the Invention are human antibodies, most preferably the AIN457 antibody or direct equivalents thereof.

The Antibodies of the Invention block the effects of IL-17 on its target cells and thus are indicated for use in the treatment of IL-17 mediated diseases and disorders. These and other pharmacological activities of the Antibodies of the Invention may be demonstrated in standard test methods for example as described below:

Neutralization of IL-17 dependent production of interleukin-6 by primary human fibroblasts:

The production of IL-6 in primary human (dermal) fibroblasts is dependent on IL-17 (Hwang SY et al., (2004) Arthritis Res Ther; 6:R120-128.

In short, human dermal fibroblasts are stimulated with recombinant IL-17 in the presence of various concentrations of Antibody of the Invention or human IL-17 receptor with Fc part. The chimeric anti-CD25 antibody Simulect® (basiliximab) is used as a negative control. Supernatant is taken after 16 h stimulation and assayed for IL-6 by ELISA. Antibodies of the Invention typically have IC₅₀s for inhibition of IL-6 production (in the presence 1 nM human IL-17) of about 50 nM or less (e.g. from about 0.01 to about 50 nM) when tested as above, i.e. said inhibitory activity is measured on IL-6 production induced by hu-IL-17 in human dermal fibroblasts. Preferably, the Antibodies of the Invention have an IC₅₀ for inhibition of IL-6 production as defined above of about 20 nM or less, more preferably of about 10 nM or less, more preferably of about 5 nM or less, more preferably of about 2 nM or less, more preferably of about 1 nM or less.

As indicated in the above assay Antibodies of the Invention potently block the effects of IL-17. Accordingly, the Antibodies of the Invention have pharmaceutical utility as follows:

Antibodies of the Invention are useful for the prophylaxis and treatment of IL-17 mediated diseases or medical conditions, e.g. inflammatory conditions, allergies and allergic

conditions, hypersensitivity reactions, autoimmune diseases, severe infections, and organ or tissue transplant rejection.

For example, Antibodies of the Invention may be use for the treatment of recipients of heart, lung, combined heart-lung, liver, kidney, pancreatic, skin or corneal transplants, including allograft rejection or xenograft rejection, and for the prevention of graft-versus-host disease, such as following bone marrow transplant, and organ transplant associated arteriosclerosis.

Antibodies of the Invention are particularly useful for the treatment, prevention, or amelioration of autoimmune disease and of inflammatory conditions, in particular inflammatory conditions with an aetiology including an autoimmune component such as arthritis (for example rheumatoid arthritis, arthritis chronica progrediente and arthritis deformans) and rheumatic diseases, including inflammatory conditions and rheumatic diseases involving bone loss, inflammatory pain, spondyloarthropathies including ankylosing spondylitis, Reiter syndrome, reactive arthritis, psoriatic arthritis, and enteropathic arthritis, hypersensitivity (including both airways hypersensitivity and dermal hypersensitivity) and allergies. Specific auto-immune diseases for which Antibodies of the Invention may be employed include autoimmune haematological disorders (including e.g. hemolytic anaemia, aplastic anaemia, pure red cell anaemia and idiopathic thrombocytopenia), systemic lupus erythematosus, inflammatory muscle disorders, polychondritis, scleroderma, Wegener granulomatosis, dermatomyositis, chronic active hepatitis, myasthenia gravis, psoriasis, Steven-Johnson syndrome, idiopathic sprue, autoimmune inflammatory bowel disease (including e.g. ulcerative colitis, Crohn's disease and Irritable Bowel Syndrome), endocrine ophthalmopathy, Graves disease, sarcoidosis, multiple sclerosis, primary biliary cirrhosis, juvenile diabetes (diabetes mellitus type I), uveitis (anterior and posterior), keratoconjunctivitis sicca and vernal keratoconjunctivitis, interstitial lung fibrosis, psoriatic arthritis and glomerulonephritis (with and without nephrotic syndrome, e.g. including idiopathic nephrotic syndrome or minimal change nephropathy), tumors, multiple sclerosis, inflammatory disease of skin and cornea, myositis, loosening of bone implants, metabolic disorders, such as atherosclerosis, diabetes, and dyslipidemia.

Antibodies of the Invention are also useful for the treatment, prevention, or amelioration of asthma, bronchitis, pneumoconiosis, pulmonary emphysema, and other obstructive or inflammatory diseases of the airways.

Antibodies of the Invention are useful for treating undesirable acute and hyperacute inflammatory reactions which are mediated by IL-17 or involve IL-17 production, or the promotion of TNF release by IL-17, e.g. acute infections, for example septic shock (e.g., endotoxic shock and adult respiratory distress syndrome), meningitis, pneumonia; and severe burns; and for the treatment of cachexia or wasting syndrome associated with morbid TNF release, consequent to infection, cancer, or organ dysfunction, especially AIDS -related cachexia, e.g., associated with or consequential to HIV infection.

Antibodies of the Invention are particularly useful for treating diseases of bone metabolism including osteoarthritis, osteoporosis and other inflammatory arthritides, and bone loss in general, including age-related bone loss, and in particular periodontal disease.

For these indications, the appropriate dosage will, of course, vary depending upon, for example, the particular Antibody of the Invention to be employed, the host, the mode of administration and the nature and severity of the condition being treated. However, in prophylactic use, satisfactory results are generally indicated to be obtained at dosages from about 0.05 mg to about 10 mg per kilogram body weight more usually from about 0.1 mg to about 5 mg per kilogram body weight. The frequency of dosing for prophylactic uses will normally be in the range from about once per week up to about once every 3 months, more usually in the range from about once every 2 weeks up to about once every 10 weeks, e.g. once every 4 to 8 weeks. Antibody of the Invention is conveniently administered parenterally, intravenously, e.g. into the antecubital or other peripheral vein, intramuscularly, or subcutaneously. A prophylactic treatment typically comprises administering the Antibody of the Invention once per month to once every 2 to 3 months, or less frequently.

The Antibodies of the Invention may be administered as the sole active ingredient or in conjunction with, e.g. as an adjuvant to or in combination to, other drugs e.g. immunosuppressive or immunomodulating agents or other anti-inflammatory agents, e.g. for the treatment or prevention of diseases mentioned above. For example, the Antibodies of the Invention may be used in combination with DMARD, e.g. Gold salts, sulphasalazine, antimalarias, methotrexate, D-penicillamine, azathioprine, mycophenolic acid, cyclosporine A, tacrolimus, sirolimus, minocycline, leflunomide, glucocorticoids; a calcineurin inhibitor, e.g.

cyclosporin A or FK 506; a modulator of lymphocyte recirculation, e.g. FTY720 and FTY720 analogs; a mTOR inhibitor, e.g. rapamycin, 40-O-(2-hydroxyethyl)-rapamycin, CCI779, ABT578, AP23573 or TAPA-93; an ascomycin having immuno-suppressive properties, e.g. ABT-281, ASM981, etc.; corticosteroids; cyclo-phos-phamide; azathioprene; methotrexate; leflunomide; mizoribine; mycophenolic acid; myco-pheno-late mofetil; 15-deoxyspergualine or an immunosuppressive homologue, analogue or derivative thereof; immunosuppressive monoclonal antibodies, e.g., monoclonal antibodies to leukocyte receptors, e.g., MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD40, CD45, CD58, CD80, CD86 or their ligands; other immunomodulatory compounds, e.g. a recombinant binding molecule having at least a portion of the extracellular domain of CTLA4 or a mutant thereof, e.g. an at least extracellular portion of CTLA4 or a mutant thereof joined to a non-CTLA4 protein sequence, e.g. CTLA4Ig (for ex. designated ATCC 68629) or a mutant thereof, e.g. LEA29Y; adhesion molecule inhibitors, e.g. LFA-1 antagonists, ICAM-1 or -3 antagonists, VCAM-4 antagonists or VLA-4 antagonists; or a chemotherapeutic agent, e.g. paclitaxel, gemcitabine, cisplatinum, doxorubicin or 5-fluorouracil; anti TNF agents, e.g. monoclonal antibodies to TNF, e.g. infliximab, adalimumab, CDP870, or receptor constructs to TNF-RI or TNF-RII, e.g. Etanercept, PBG-TNF-RI; blockers of proinflammatory cytokines, . IL-1 blockers, e.g. Anakinra or IL-1 trap, AAL160, ACZ 885, IL-6 blockers; chemokines blockers, e.g. inhibitors or activators of proteases, e.g. metalloproteases, anti-IL-15 antibodies, anti-IL-6 antibodies, anti-CD20 antibodies, NSAIDs, such as aspirin or an anti-infectious agent (list not limited to the agent mentioned).

In accordance with the foregoing the present invention provides in a yet further aspect:

A method as defined above comprising co-administration, e.g. concomitantly or in sequence, of a therapeutically effective amount of an IL-17 binding molecule, e.g. an Antibody of the Invention, and at least one second drug substance, said second drug substance being a immuno-suppressive / immunomodulatory, anti-inflammatory chemotherapeutic or anti-infectious drug, e.g. as indicated above.

Or, a therapeutic combination, e.g. a kit, comprising of a therapeutically effective amount of a) an IL-17 binding molecule, e.g. an Antibody of the Invention, and b) at least one second substance selected from a immuno-suppressive / immunomodulatory, anti-inflammatory

chemotherapeutic or anti-infectious drug, e.g. as indicated above. The kit may comprise instructions for its administration.

Where the Antibodies of the Invention are administered in conjunction with other immuno-suppressive / immunomodulatory, anti-inflammatory chemotherapeutic or anti-infectious therapy, dosages of the co-administered combination compound will of course vary depending on the type of co-drug employed, e.g. whether it is a DMARD, anti-TNF, IL-1 blocker or others, on the specific drug employed, on the condition being treated and so forth.

Pharmaceutical compositions of the invention may be manufactured in conventional manner. A composition according to the invention is preferably provided in lyophilized form. For immediate administration it is dissolved in a suitable aqueous carrier, for example sterile water for injection or sterile buffered physiological saline. If it is considered desirable to make up a solution of larger volume for administration by infusion rather as a bolus injection, it is advantageous to incorporate human serum albumin or the patient's own heparinised blood into the saline at the time of formulation. Alternatively, the formulation is given subcutaneous. The presence of an excess of such physiologically inert protein prevents loss of antibody by adsorption onto the walls of the container and tubing used with the infusion solution. If albumin is used, a suitable concentration is from 0.5 to 4.5% by weight of the saline solution. Other formulations comprise liquid or lyophilized formulation.

The invention is further described by way of illustration in the following Examples.

EXAMPLES

Transgenic mice engineered to express the human IgG/k repertoire instead of the murine immunoglobulin repertoire (Fishwild et al., 1996, Nat Biotechnol., 14, 845-851) are used to generate antibodies to human IL-17. B cells from these mice are immortalized by standard hybridoma technology and murine hybridoma cells are obtained which secrete the human IgG1/k antibody AIN457.

Example 1: Generation of the hybridoma, purification of the antibodies, selection of AIN457 antibody

Production of recombinant human IL-17 (huIL-17): Recombinant huIL-17 is either produced in *E. coli* in inclusion bodies and refolded by conventional techniques (produced in house carrier free (*E. coli*; Novartis Pharma, batch BM-E3141/98) or bought (carrier free, *E. coli*; R&D Systems #317-IL/CF)) or as secreted and partially glycosylated protein in HEK/EBNA (Recombinant huIL-17, carrier free (IL-17 APP-C6 from transfected HEK/EBNA cells; Novartis Pharma, batch En.E-3382/82; 0.28 mg/ml; recombinant huIL-17, carrier free (IL-17 APP-C4 from transfected HEK/EBNA cells; Novartis Pharma, batch En.E-3382/83; 0.29 mg/ml)). The latter form features a C-terminal 4 amino acids extension for rapid purification from culture supernatants by immunoaffinity chromatography. In this case, culture supernatants are loaded on a column of appropriate size of a specific immobilized anti-tag antibody coupled to CNBr activated Sepharose 4B at a density of 10 mg/ml resin following the manufacturer's instructions (Pharmacia). After base-line washing with PBS, bound huIL-17 is eluted with 100 mM glycine, pH 2.7 and immediately neutralized with diluted NaOH.

Coupling of huIL-17 to Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH): HuIL-17 produced in either *E. coli* or HEK/EBNA is coupled to KLH pre-activated with an excess of the homobifunctional cross-linker Disuccinimidyl suberate (DSS). Briefly, 20 mg lyophilized Inject[®] Mariculture KLH (Pierce # 77600) are reconstituted with 2 ml H₂O to give a 10 mg/ml solution containing Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.2. To this solution 400 µl of 250 mM DSS in Dimethyl Sulfoxide (DMSO) are added and the mixture stirred for about 1 hr at room temperature (not all the reagent dissolved and some precipitate formed). After a brief centrifugation and filtration (0.45 µm) the solution is then desalted on Sephadex G25 fine (Pharmacia) in PBS (flow rate 2 ml/min) yielding about 11 mg activated KLH at 1.5 mg/ml (Bradford). 1 ml of the activated KLH

(1.5 mg) is mixed with 1 ml of a 9 mg/ml solution in water of lyophilized *E. coli* derived huIL-17 (batch BM-E3141/98). The solution remains clear and is incubated for 2 hrs at room temperature. The concentration of the resulting complex is 1.4 mg/ml (measured by Bradford). 1 ml of the activated KLH (1.5 mg) is mixed with 1 ml of HEK-EBNA huIL-17 (about 3 mg in water ; batch En.E-3382/83). The solution remains clear and is incubated for 2 hrs at room temperature. Concentration (Bradford) is 2.9 mg/ml.

Immunization: The genetically engineered mouse 27340 (female; MEDAREX Inc, Amundale, NJ) in which the murine immunoglobulin variable and constant part genes are functionally replaced by their human counterparts (Genotype Tg code 221100-TgH (CMD)++;TgN(Hco7)11952+; TgH(JKD)++; TgN(KCO5)9272+ (see also Sherie L. Morrison, 1994, Nature, Vol. 368, p. 812-813; Nils Lönberg et al., 1994, Nature, Vol. 368, p. 856-859) is immunized following the scheme reported in table 1.

Table 1. Immunization schedule

<i>Day</i>	<i>Date</i>	<i>Immunogen</i>	<i>Dose and route of immunization</i>
0	07.06.01	HuIL-17 (BM-E3141/98) coupled to KLH mixed 1:1 with huIL-17 (BM-E3141/98) in Gerbu adjuvant	25 µg of each s.c. in two spots; total volume/mouse with adjuvant 100 µl
14	21.06.01	HuIL-17 (BM-E3141/98) coupled to KLH mixed 1:1 with huIL-17 (En.E-3382/83) coupled to KLH in Gerbu adjuvant	25 µg of each s.c. in two spots; total volume/mouse with adjuvant 100 µl
28	05.07.01	HuIL-17 (BM-E3141/98) mixed 1:1 with huIL-17 (En.E-3382/83) in Gerbu adjuvant	10 µg of each s.c. in two spots; total volume/mouse with adjuvant 100 µl
35	12.07.01		Sera collected for ELISA
42	19.07.01	HuIL-17 (BM-E3141/98) mixed 1:1 with huIL-17 (En.E-3382/83) coupled to KLH in Gerbu adjuvant	20 µg of each s.c. in two spots; total volume/mouse with adjuvant 100 µl
63	09.08.01	HuIL-17 (BM-E3141/98) coupled to KLH mixed 1:1 with huIL-17 (En.E-3382/83) coupled to KLH in Gerbu adjuvant	20 µg of each s.c. in two spots; total volume/mouse with adjuvant 100 µl
91	06.09.01	HuIL-17 (BM-E3141/98) mixed 1:1 with	20 µg of each s.c. in two

40
25

(5 th boost)		huIL-17 (En.E-3382/83) in Gerbu adjuvant	spots; total volume/mouse with adjuvant 100 μ l
99	14.09.01		Sera collected for ELISA
117	02.10.01	HuIL-17 (En.E-3382/83)	10 μ g/mouse i.v.
		HuIL-17 (En.E-3382/83) coupled to KLH	10 μ g/mouse i.p.
118	03.10.01	HuIL-17 (En.E-3382/83) coupled to KLH	10 μ g/mouse i.p.
119	04.10.01	HuIL-17 (En.E-3382/83) coupled to KLH	10 μ g/mouse i.p.
120	05.10.01	fusion	

Sera samples are obtained 35 and 99 days after the start of the immunization protocol, for measuring levels of anti-huIL17 antibody by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Generation of hybridomas: On day 120, mouse 27340 is killed by CO₂ inhalation. Total spleen cells (1×10^8) are fused with PAI-0 cells (5×10^7 cells) using PEG 4000. Fused cells are plated out in 720 wells (1 ml/well), containing a feeder layer of mouse peritoneal cells (Balb/c mice), in HAT medium (RPMI 1640 containing 2 g/l Sodium Bicarbonate, 5×10^{-5} M β -Mercaptoethanol, 10^{-4} M Hypoxanthine, 1.6×10^{-5} M Thymidine, 4×10^{-7} M Aminopterin, 10% heat inactivated FCS and 50 μ g/ml Gentamycin). At day 14, HAT medium is exchanged with HT medium i.e. HAT medium without Aminopterin. Screening starts on day 10, and lasts two weeks. Of the initial 720 wells plated, 684 wells (95%) are positive for hybridoma growth. Supernatants are collected and screened for huIL-17 reactive MAb in ELISA using both the E. coli and the HEK/EBNA derived huIL-17. Fifty-two primary wells score positive for the presence of anti-huIL-17 antibodies. Twenty-eight hybridomas are cloned and the remaining ones are frozen. Cloning is done, in 4 x 96 well microtiter plates, in HT medium and a feeder layer of mouse peritoneal cells. Hybridomas are plated at 0.5 cell/100 μ l per well. Wells are screened microscopically for growth, and positive ones are fed 100 μ l of HT medium. The following day, supernatants are tested for antibody production in a huIL-17 specific ELISA. Upon cloning, the majority of the cloned hybridomas retain the capacity to secrete anti-huIL-17 specific Monoclonal Antibody (MAb).

Production and purification of antibody: The selected clones are transferred in serum free medium (5 ml) into 25 cm² TC (TC: tissue culture) flasks. Hybridomas are progressively expanded in serum free medium to 75 cm² TC flasks and roller flasks. All the different anti-hu-

IL-17 MAb including NVP-AIN457-NX (340-110-28 i.e. mouse number-hybridoma number-clone number) are purified by Protein A affinity chromatography. Culture supernatants are adjusted to pH 7.3 and loaded on a column of appropriate size of Protein A Sepharose 4 fast flow (Pharmacia). After base-line washing with 100 mM phosphate buffer, pH 7.3 bound antibodies are eluted with 50 mM citrate, pH 2.7, 140 mM NaCl. The eluted fraction is immediately neutralized (pH 7.0) and sterile filtered. Protein concentration is determined by absorption at 280 nm using a factor of 1.35 Absorption Unit (AU)/mg.

Inhibitory activity of anti-huIL-17 MAb on IL-6 production induced by huIL-17 in human dermal fibroblasts: Human dermal fibroblasts are cultured in FBM supplemented with 2% FCS, insulin (5 µg/ml) huFGF-basic (0.1 µg/ml) and Gentamycin (50 µg/ml). The fibroblasts are detached from plastic using a Trypsin/EDTA solution. Fibroblasts are distributed into 96 well microtiter plates at a density of 1×10^4 cells/well in FBM supplemented with 1% FCS. Fibroblasts are allowed to adhere to the plates overnight. The next morning medium is removed and fresh FBM supplemented with 1% FCS, huIL-17 (different concentrations ranging from 30 to 500 ng/ml) and hybridoma supernatants (1/5 final dilution) or purified antibodies are added to a final volume of 200 µl. Culture supernatants are collected after an incubation of 24 h and huIL-6 production is measured by ELISA.

ELISA for detection of anti-huIL-17 antibodies: ELISA microtiter plates are coated with recombinant huIL-17 (100 µl/well at 3 µg/ml; batch BM-E3141/98 or En.E-3382/82) in PBS 0.02% NaN₃ and incubated overnight at room temperature. The following day, microtiter plates are blocked with 300 µl of PBS/ 2% BSA/ 0.02% NaN₃ for 2 h at 37°C. Plates are then washed 4 times with PBS/ 0.05% Tween 20/ 0.02% NaN₃. Serum dilutions of mouse 27340 (final dilution range at day 35: 1/100 to 1/3200; final dilution range at day 99: 1/200 to 1/12800; 100 µl/well) or culture supernatants of hybridomas (final dilution 1:3; 100 µl/well) are added. After an overnight incubation at room temperature, plates are washed 4 times with PBS/ 0.05% Tween 20/ 0.02% NaN₃. A biotin-conjugated mouse anti-hu-IgG, Fc fragment specific antibody is added at a final dilution of 1/20000 (100 µl/well). Samples are left to react for 4 h at room temperature. After washing (4 times), alkaline phosphatase-conjugated streptavidin is added at a final dilution of 1/8000 (100 µl/well). After 40 minutes at room temperature, plates are washed again 4 times and the substrate (p-nitrophenylphosphate in diethylamino buffer pH 9.8; 150 µl/well) is added. Plates are read after 30 or 45 min depending on the development of the reaction in a microtiter

reader (Bio-Rad) using filters of 405 and 490 nm.

ELISA for detection of antibody isotype: For revealing the isotype of the MAb, culture supernatants (100 μ l; final dilution 1/5) are added to the wells of microtiter plates coated with huIL-17 (see above), and incubated overnight at room temperature. After washing (4 times), 100 μ l/well of biotin-conjugated mouse MAbs anti-human IgG1 (final dilution 1/1000), IgG2 (final dilution 1/1000), IgG3 (final dilution 1/1000) IgG4 (final dilution 1/2000) or anti human κ light chain (final dilution 1/1000) are added for 4 h at room temperature. As a control a biotin-conjugated rat anti-mouse λ 1 and λ 2 light chain specific MAb is used (final dilution 1/1000). This is followed as previously described by washing and addition of alkaline phosphatase-conjugated streptavidin (100 μ l; final dilution 1/8000). After washing (4 times) the substrate (p-nitrophenylphosphate in diethylamino buffer; 100 μ l) is added. Plates are read after 30 or 45 min depending on development of reaction, in a microtiter reader (Bio-Rad) using filters of 405 and 490 nm.

ELISA for detection of huIL-6 production: ELISA microtiter plates are coated with an anti-huIL-6 mouse MAb (MAB206 from R&D system; 100 μ l/well at 4 μ g/ml) in PBS 0.02% NaN_3 and incubated overnight at room temperature. The following day, microtiter plates were blocked with 300 μ l of PBS/ 2% BSA/ 0.02% NaN_3 for 2 h at 37°C. Plates were then washed 4 times with PBS/ 0.05% Tween 20/ 0.02% NaN_3 . Culture supernatants of human dermal fibroblasts (final dilution 1:3; 100 μ l/well) were added. To establish a titration curve huIL-6 (100 μ l/well) is titrated from 400 pg/ml to 3.1 pg/ml in 1:2 dilution steps. After an overnight incubation at room temperature, plates are washed 4 times with PBS/ 0.05% Tween 20/ 0.02% NaN_3 . A biotin-conjugated goat anti-huIL-6 antibody (BAP206; R&D Systems) is added (25 ng/ml; 100 μ l/well). Samples are left to react for 4 h at room temperature. After washing (4 times), alkaline phosphatase-conjugated streptavidin is added at a final dilution of 1/8000 (100 μ l/well). After 40 minutes at room temperature, plates are washed again 4 times and the substrate (p-nitrophenylphosphate in diethylamino buffer pH 9.8; 150 μ l/well) is added. Plates are read after 30 min in a microtiter reader (Bio-Rad) using filters of 405 and 490 nm.

Calculations: Values are reported as original O.D. values or as % inhibition calculated on the means of duplicate values. Additional data are reported as Means $\pm$ SEM. An huIL-6 standard curve was used to measure huIL-6 concentration in culture supernatants by using a cubic curve fit.

Results

Serum titers of mouse 27340:

Table 2. Anti-huLL-17 serum titers (mouse 27340)

Day	HuLL-17 batch*	Serum dilution						
		O.D. values (Means $\pm$ SEM)						
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400 1:12800
35	<i>E. coli</i>	1.795	1.524	1.167	0.854	0.615	0.378	
		± 0.022	± 0.006	± 0.015	± 0.013	± 0.005	± 0.032	
	<i>HEK/EBNA</i>	2.180	1.875	1.577	1.313	1.031	0.728	
		± 0.041	± 0.005	± 0.047	± 0.016	± 0.011	± 0.003	
99	<i>E. coli</i>		2.130	1.913	1.635	1.494	1.125	0.810 0.559
			± 0.078	± 0.075	± 0.041	± 0.066	± 0.001	$\pm 0.070 \pm 0.021$
	<i>HEK/EBNA</i>		2.029	1.925	1.716	1.524	1.259	0.970 0.706
			± 0.005	± 0.030	± 0.012	± 0.004	± 0.018	$\pm 0.036 \pm 0.002$

* Microtiter plates were coated with huLL-17 (3 μ g/ml) from *E. coli* (BM-E3141/98) or HEK/EBNA cells (En.E-3382/82).

The serum of mouse 27340 is analyzed in ELISA for the presence of anti-huLL-17 antibodies on days 35 and 99 on two different preparations of huLL-17 (Table 2). Results show that serum titers of mouse 27340 increase about fourfold between day 35 and day 99 and that both huLL-17 preparations are recognized.

Binding in ELISA of hybridoma supernatants: 684 supernatants are tested in ELISA for the presence of anti-huLL-17 antibodies, using two preparations of recombinant huLL-17, the former from *E. coli* (BM-E3141/98) the latter from HEK/EBNA cells (En.E-3382/82). Fifty-two supernatants score positive for the presence of anti-huLL-17 antibodies (Table 3). Preferential binding to one or the other preparation of huLL-17 is observed in a few cases. The 28 hybridomas that are subsequently cloned are underlined.

Table 3. ELISA reactivity of culture supernatants

<i>Hybridoma</i> (No)	<i>HuIL-17 batch*</i>		<i>Hybridoma</i> (No)	<i>HuIL-17 batch</i>	
	<i>E. coli</i> <i>O.D. values</i>	<i>HEK/EBNA</i> <i>O.D. values</i>		<i>E. coli</i> <i>O.D. values</i>	<i>HEK/EBNA</i> <i>O.D. values</i>
<u>1</u>	<u>1.935/1.830</u>	<u>ND</u>	<u>386</u>	<u>1.780/1.812</u>	<u>2.002/1.905</u>
<u>3</u>	<u>1.928/1.928</u>	<u>2.026/1.956</u>	<u>435</u>	<u>2.194/2.139</u>	<u>2.221/2.169</u>
<u>5</u>	<u>1.386/1.471</u>	<u>2.099/2.042</u>	<u>439</u>	<u>1.180/1.236</u>	<u>1.442/1.470</u>
<u>59</u>	<u>1.917/2.078</u>	<u>2.342/2.384</u>	<u>444</u>	<u>1.034/1.066</u>	<u>1.166/1.138</u>
<u>66</u>	<u>1.629/1.619</u>	<u>ND</u>	<u>450</u>	<u>2.060/2.209</u>	<u>2.079/2.237</u>
<u>104</u>	<u>2.650/2.716</u>	<u>2.439/2.366</u>	<u>477</u>	<u>1.392/1.348</u>	<u>1.515/1.524</u>
<u>106</u>	<u>1.329/1.371</u>	<u>1.362/1.465</u>	<u>496</u>	<u>2.131/2.078</u>	<u>2.569/2.798</u>
<u>110</u>	<u>2.355/2.363</u>	<u>2.425/2.497</u>	<u>504</u>	<u>1.755/1.559</u>	<u>ND</u>
<u>112</u>	<u>0.789/0.857</u>	<u>1.154/1.208</u>	<u>543</u>	<u>2.332/2.455</u>	<u>2.370/2.381</u>
<u>116</u>	<u>1.656/1.652</u>	<u>ND</u>	<u>544</u>	<u>1.145/1.196</u>	<u>1.187/1.201</u>
<u>128</u>	<u>1.244/1.669</u>	<u>0.714/0.695</u>	<u>548</u>	<u>0.728/0.750</u>	<u>0.891/0.909</u>
<u>142</u>	<u>1.192/1.322</u>	<u>0.847/0.810</u>	<u>552</u>	<u>0.824/0.811</u>	<u>0.969/0.943</u>
<u>173</u>	<u>1.899/2.108</u>	<u>1.966/2.023</u>	<u>557</u>	<u>2.241/2.326</u>	<u>2.347/2.483</u>
<u>182</u>	<u>0.948/0.903</u>	<u>0.874/0.866</u>	<u>564</u>	<u>0.628/0.675</u>	<u>0.808/0.820</u>
<u>190</u>	<u>2.249/2.084</u>	<u>2.150/2.139</u>	<u>566</u>	<u>1.092/1.068</u>	<u>1.239/1.152</u>
<u>196</u>	<u>1.406/1.305</u>	<u>1.797/1.752</u>	<u>577</u>	<u>1.018/0.928</u>	<u>1.226/1.206</u>
<u>216</u>	<u>1.120/1.146</u>	<u>1.114/1.128</u>	<u>597</u>	<u>0.781/0.821</u>	<u>1.117/1.121</u>
<u>234</u>	<u>1.890/1.990</u>	<u>ND</u>	<u>612</u>	<u>1.935/1.777</u>	<u>2.033/1.989</u>
<u>277</u>	<u>1.674/1.640</u>	<u>ND</u>	<u>622</u>	<u>2.121/2.230</u>	<u>2.592/2.277</u>
<u>285</u>	<u>0.678/0.789</u>	<u>0.735/0.784</u>	<u>627</u>	<u>1.000/1.077</u>	<u>1.203/1.209</u>
<u>298</u>	<u>2.475/2.677</u>	<u>2.340/2.358</u>	<u>649</u>	<u>1.335/1.389</u>	<u>1.311/1.337</u>
<u>305</u>	<u>1.721/1.789</u>	<u>0.602/0.634</u>	<u>658</u>	<u>1.218/1.297</u>	<u>1.415/1.437</u>
<u>319</u>	<u>1.111/1.073</u>	<u>1.223/1.202</u>	<u>674</u>	<u>1.112/1.087</u>	<u>1.134/1.127</u>
<u>328</u>	<u>1.738/1.762</u>	<u>1.869/1.835</u>	<u>686</u>	<u>1.447/1.549</u>	<u>1.730/1.646</u>
<u>343</u>	<u>2.478/2.702</u>	<u>2.302/2.448</u>	<u>705</u>	<u>1.899/1.803</u>	<u>1.870/1.872</u>
<u>373</u>	<u>1.200/1.194</u>	<u>1.212/1.233</u>	<u>720</u>	<u>2.249/2.420</u>	<u>2.383/2.385</u>

*Plates are coated with recombinant huIL-17 (3 µg/ml) from *E. coli* (BM-E3141/98) or HEK/EBNA cells (En.E-3382/82). Supernatants are tested at the final dilution of 1/4.

Binding in ELISA of culture supernatants of the hybridoma clones: The reactivity in ELISA of the supernatants of the clones of the 11 hybridomas, which retained the best production of anti-huIL-17 MAb, is shown in Table 4. The clones, highlighted in bold, were selected for producing ~ 1 liter of supernatant in roller bottles for purification and analysis of the antibodies. With the exception of the clones derived from the hybridoma No 5, which produced a huIgG3 κ antibody, all the other clones produced huIgG1 κ MAb, as assessed by isotype specific monoclonal antibodies.

Table 4. ELISA reactivity of culture supernatants for hu-IL-17.

<i>Clone</i>	<i>Supernatants*</i>	<i>Clone</i>	<i>Supernatants*</i>	<i>Clone</i>	<i>Supernatants*</i>
<i>(No)</i>	<i>O.D. values</i>	<i>(No)</i>	<i>O.D. values</i>	<i>(No)</i>	<i>O.D. values</i>
3-2	2.198/1.940	106-1	1.244/1.306	543-4	1.003/0.913
3-20	1.909/1.939	106.2	1.203/1.138	543-16	0.795/0.717
3-21	1.873/1.812	106-3	1.176/1.166	557-6	0.879/0.940
5-18	1.240/1.168	110-7	1.535/1.393	557-36	0.980/0.925
5-22	1.340/1.396	110-28	1.376/1.370	557-37	1.104/1.109
5-29	1.316/1.354	305-21	1.484/1.518	622-2	0.923/0.894
5-31	1.227/1.302	305-38	1.669/1.858	622-5	1.070/1.032
5-40	1.364/1.543	343-1	1.351/1.375	622-6	0.980/0.953
104-2	1.385/1.299	439-80	2.506/2.543	658-2	0.744/0.744
104-4	1.085/1.044	450-13	1.568/1.610	658-6	0.769/0.772
104-9	1.488/1.304	450-23	1.658/1.667	658-16	0.741/0.758
104-11	1.670/1.380	543-1	1.074/0.991		

Microtiter plates are coated with recombinant huIL-17 (3 μ g/ml) from HEK/EBNA cells (En.E-3382/82).

Neutralizing activity of culture supernatants: Culture supernatants are tested for inhibition of huIL-6 production by human dermal fibroblasts stimulated with recombinant huIL-17. As shown in Table 5, the majority of the culture supernatants show inhibitory activity.

Table 5. Inhibition of IL-6 production induced by huIL-17 in human dermal fibroblasts by culture supernatants

Clone (No)	Inhibition of IL-6 production (%)			
	Amount of huIL-17 used as stimulus (ng/ml)			
	62.5	125	250	500
3-20	86.3	75.0	33.1	23.2
5-40	23.3	41.4	20.3	19.0
104-11	47.7	48.5	22.2	16.3
106.1	61.6	19.8	5.7	9.8
110-28	99.8	92.5	88.6	61.3
305-38	47.2	47.1	36.6	23.7
343-1	96.8	102.4	90.5	66.4
450-23	51.7	48.5	47.5	26.6
543.4	-6.0	-12.0	-6.5	-7.1
622-2	34.0	23.2	20.3	18.4
658-16	34.4	27.7	12.7	18.8

Neutralizing activity of AIN45: Selection of clone 110-28 for the production of development candidate AIN457 (preferred embodiment of the invention) is based on neutralizing activity and affinity measurement on BIACORE 2000 of the purified antibodies (see below Example 2).

Example 2: AIN457 binds with very high affinity to recombinant human IL-17 (huIL-17); the K_D is 122 ± 22 pM (BIAcore) and neutralizes human IL-6 production induced by huIL-17 in human dermal fibroblast; IC50 is 2.1 ± 0.1 nM at a concentration of 1.87 nM huIL-17

a) Methods

Reagents: General laboratory reagents are purchased from Merck or Sigma and are of the highest purity grade available; the sources of specialty reagents are detailed below.

Proteins: Monoclonal antibodies are generated by immunizing MEDAREX transgenic mice with recombinant human IL-17, and then following the standard procedure for producing cell lines,

47

from which the secreted material could be purified by Protein A Sepharose chromatography [essentially as described in Example 1). AIN457 is stored as a sterile-filtered solution in 50 mM Na-citrate, pH 7.0, 140 mM NaCl at 4°C. The recombinant human AIN457 (batch KB03303A) is obtained in sterile stock solution of either 20 mM Na-citrate/40 mM phosphate buffer, pH 7, 150 mM NaCl or 20 mM acetic acid pH 5.5 adjusted with 1M Tris-base. Concentrations are usually in the range of 2 mg/ml and diluted to a final concentration of 5 µg/ml into BIA buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% v/v Tween-20) for the Biacore experiments.

Recombinant human IL-17 is produced in-house; batch En/E 3882/83; 0.29 mg/ml.

Biacore measurements

Determination of kinetic binding parameters and levels of crossreactivity are done by surface plasmon resonance measurements using the optical biosensor Biacore 2000 (Biacore AB, Uppsala, Sweden, see Lit. HS 1,2 for details). This technology allows the label-free determination the microscopic rate constants for binding (k_{on}) and dissociation (k_{off}) of a ligand to a receptor. It is therefore especially suited for characterizing the antibody-antigen interactions. This technology complements and is in many respects superior to ELISA measurements (Van Regenmortel, Dev Biol (Basel). 2003;112:141-51.) Binding studies of recombinant IL-17 to the IL-17 antibody AIN457 are performed in two ways. In the standard protocol, AIN457 is captured by an anti-human Fcγ antibody (Jackson Immunochemicals; Cat.No. 109-005-098) that is previously immobilized onto a CM-5 Biacore sensor chip (Research grade). Covalent binding of Fcγ capture antibody is done with the 'Amine coupling kit' provided by Biacore (Biacore, Cat.No. BR-1000-50). Typically, 3000 RUs of capture antibody are attached to the activated dextran surface with a 30 µg/ml anti Fcγ antibody solution in 10 mM Ac buffer, pH 4.5 at a flow rate of 5 µl/min which lead to approximately 250 RUs of AIN457 immobilization. As a guideline, 1000 RUs correspond to a mass transfer of 1 ng/mm². Alternatively, IL-17 (Section 3.2; Table 4), AIN457 antibody is coupled directly to the chip surface without capture antibody. The results are compared to the protocol described in Table 9 (see below).

b) Results

Binding kinetics of the IL-17/ AIN457 complex

The equilibrium dissociation constant K_D allows some judgement about the stability of complexes, once formed *in vivo*. We have therefore determined kinetic constants for the binding of human IL-17 to the immobilized AIN457 antibody, and have derived the K_D for the process

from these data. Table 3 shows the summary of data obtained when the curves of 2 experiments are fitted to the Langmuir model using the BIAevaluation 3.0 software. Although the antibody is, of course, bivalent, the binding can be treated as a 1:1 event, with individual antibody binding sites displayed at the surface that become occupied by monomeric IL-17 molecules. This experiment shows both, the extremely fast association as well as the very slow dissociation kinetics of the antibody-chemokine complex. The best data fit is obtained when the sensorgrams are treated individually (rather than globally, as is suggested in the BIAevaluation.) Thus, after combining the titration series we obtain average values from 12 sensorgrams of $k_{on} = (4.1 \pm 0.1) \times 10^5$ 1/M s; $k_{off} = (3.8 \pm 0.5) \times 10^{-4}$ 1/s; and for $K_D = 122 \pm 22$ pM.

Table 3. Kinetic constants for the 1:1 binding of rec human IL-17 to NVP-AIN457

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

Mean K_D calculated from individual entries (vertically), rather than by applying the equation $K_D = k_{off}/k_{on}$.

For the AIN457 produced in recombinant cells (KB03303A) affinity measurements are performed for the IL-17 cytokines from man, marmoset, rhesus and cynomolgous monkey, respectively. Experimental details of the Biscore measurements are the same as described above for MAB110-28 antibody. Two independent runs testing 6 IL-17 concentrations in each run are performed. Concentrations for human IL-17 are 2, 4, 8, 12, 16, 20 nM and 10, 20, 30, 40, 50, 60

nM for all other species. Complete data analysis yields n=12 individual measurements for each IL-17 species. The K_D as well as SEM is reported.

Table 4. Summary: Kinetic constants for the 1:1 binding of rec human, marmoset, rhesus and cynomolgous monkey IL-17 to NVP-AIN457 (KB03303A)

Species	KD [M]	SEM
	Mean	
	Run 1+2	
Human	0.227 nM	+/- 0.03 nM
Marmoset	1.2 nM	+/- 0.1 nM
Rhesus monkey	9 nM	+/- 1 nM
Cynomolgous monkey	6 nM	+/- 0.7 nM

A full set data of the BIAcore analysis for antibody KB03303A with k_{on} , k_{off} and K_D and the respective IL-17 species are given below in tables 5 to 8.

Table 5. Kinetic constants for the 1:1 binding of rec human IL-17 to AIN457 (KB03303A)

Conc [nM]	kon [1/Ms]	koff [1/s]	KD [M]	Exp. IL-366/ IL-365
2	3.37E+05	6.43E-05	1.91E-10	Run 1
4	2.59E+05	7.76E-05	2.99E-10	
8	2.12E+05	5.21E-05	2.46E-10	
12	2.18E+05	7.38E-05	3.38E-10	
16	2.02E+05	7.15E-05	3.54E-10	
20	1.92E+05	8.04E-05	4.20E-10	
2	5.50E+05	7.01E-05	1.27E-10	Run 2
4	3.22E+05	3.30E-05	1.02E-10	
8	2.85E+05	4.73E-05	1.66E-10	
12	2.86E+05	4.84E-05	1.69E-10	

16	2.61E+05	3.09E-05	1.18E-10	
20	2.58E+05	4.90E-05	1.90E-10	
Mean	2.82E+05	5.82E-05	2.27E-10	n=12
SEM	2.77E+04	4.91E-06	3.00E-11	

Table 6. Kinetic constants for the 1:1 binding of rec marmoset IL-17 to AIN457 (KB03303A)

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

Table 7. Kinetic constants for the 1:1 binding of rec rhesus monkey IL-17 to AIN457 (KB03303A)

Conc [nM]	kon [1/Ms]	koff [1/s]	KD [M]	Exp. IL-366/ IL-365
10	1.70E+05	3.89E-04	2.28E-09	Run 1
20	6.73E+04	4.94E-04	7.34E-09	
30	5.86E+04	3.54E-04	6.04E-09	
40	3.27E+04	4.05E-04	1.24E-08	
50	4.05E+04	4.55E-04	1.12E-08	
60	3.50E+04	4.60E-04	1.31E-08	

10	5.47E+04	3.85E-04	7.04E-09	Run 2
20	4.62E+04	2.74E-04	5.93E-09	
30	4.30E+04	3.51E-04	8.16E-09	
40	3.76E+04	3.66E-04	9.74E-09	
50	3.60E+04	4.32E-04	1.20E-08	
60	3.44E+04	4.24E-04	1.23E-08	
Mean	5.47E+04	3.99E-04	8.96E-09	n=12
SEM	1.09E+04	1.72E-05	9.70E-10	

Table 8. Kinetic constants for the 1:1 binding of rec cynomolgous monkey IL-17 to AIN457 (KB03303A)

Conc [nM]	kon [1/Ms]	koff [1/s]	KD [M]	Exp. IL-366/ IL-365
5nM	3.27E+05	3.60E-04	1.10E-09	Run 1
10nM	1.79E+05	4.02E-04	2.24E-09	
15nM	1.03E+05	5.67E-04	5.50E-09	
20nM	1.10E+05	5.23E-04	4.75E-09	
25nM	9.23E+04	5.78E-04	6.26E-09	
30nM	9.05E+04	7.14E-04	7.89E-09	
5nM	7.18E+04	5.08E-04	7.08E-09	Run 2
10nM	9.70E+04	6.69E-04	6.90E-09	
15nM	1.03E+05	7.66E-04	7.41E-09	
20nM	1.02E+05	7.32E-04	7.17E-09	
25nM	1.02E+05	7.47E-04	7.34E-09	
30nM	1.00E+05	8.34E-04	8.32E-09	
Mean	1.23E+05	6.17E-04	6.00E-09	n=10
SEM	1.99E+04	4.34E-05	6.52E-10	

Subsequently inhibitory activity of purified AIN457 (Batch En/E-10333/53; 0.54 mg/ml) on huIL-17 is evaluated. IC₅₀ values are shown in Table 6. In these experiments, huIL-17R/Fc and a mouse anti-huIL-17 MAb are included as positive controls and Simulect as negative control.

Table 9. Neutralization of hu-IL-17 by the human anti-huIL-17 MAb AIN457 in comparison with IL-17R/Fc, and a mouse anti-huIL-17 MAb (R&D System).

	AIN457	IL-17 R/Fc	MAB 317
	IC ₅₀ ± SEM	IC ₅₀ ± SEM	IC ₅₀ ± SEM
	(n=3*)	(n=3)	(n=3)
Recombinant huIL-17 @ 1.87 nM (30 ng/ml)	2.071 ± 0.116 nM	1.713 ± 0.305 nM	12.226 ± 2.050 nM

*Means and SEM are calculated from three different and independent experiments.

In conclusion, AIN457 abrogates the IL-17-dependent secretion of huIL-6 by human dermal fibroblasts. The potency is comparable to that of huIL-17R/Fc and superior to that of a commercially available mouse anti-huIL-17 MAb. It is interesting to note that a more complete inhibition is observed with AIN457 than with IL-17R/Fc.

Example 3: Purity and partial amino acid sequences of heavy and light chain
Amino acid sequencing

Amino-terminal amino acid sequences of V_L and V_H regions: The first 48 amino-acid residues of the heavy and the light chain for two anti-IL-17A antibodies, clone 110-7 (see table 4) and 110-28 (see table 4), are determined by Edman degradation. The amino-acid sequence is identical for both clones. The GeneBank is searched by blast analysis and the most homologous DNA sequence found is used to design the cloning primers.

Molecular cloning of the V_L and V_H regions: Total RNA is prepared from 2x10⁷ hybridoma cells (clone 110-7, clone 110-28) with the RNeasy Midi Kit according to the vendor's protocol (Quiagen Hilden Germany). Total RNA is eluted in 200µl RNase-free water and stored at -80°C. The first strand cDNA synthesis is carried out with M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI), oligo-dT primer, PCR nucleotide mix (dNTPs) and RNasin inhibitor (Roche, Mannheim). Five µg of total RNA is mixed with 1 µl oligo-dT primer (0.5µg/µl), and RNase-free water is added to a final volume of 36 µl. The mixture is incubated at 70°C for 10 minutes and then stored on ice. While on ice, the following reagents are added: 10µl 5x RT buffer, 2µl dNTPs (10mM each), 2 µl RNasin and 1µl M-MLV reverse transcriptase. The reaction is carried out at 42°C for 1hour.

The PCR reaction is assembled using 4µl of cDNA template, 2µl of each primer at 10µM each (see below and Tables 10 and 11 for overview) 20µl of 2xQiamix (containing Buffer, dNTP's, TAQPolymerase) and 1µl of Pwo DNA polymerase in a total volume of 40 µl. The PCR conditions are set for 35 cycles of 94°C for 15 seconds, 55°C for 20 seconds and 72°C for 30 seconds. The PCR product is subcloned into the pCR4-TOPO-Zero (Stragagene, La Jolla, Ca.) cloning vector. Several clones are picked from each reaction and the nucleotide sequence determined by Solvias AG (Basel), using the primers MV432 (SEQ ID NO: 21), MV433 (SEQ ID NO: 22), MV434 (SEQ ID NO: 23), MV435 (SEQ ID NO: 14), and standard primers in the vector DNA.

The cDNA encoding the heavy chain is amplified using the primer pairs MV416 (SEQ ID NO: 15)/#265 (SEQ ID NO: 16) and MV418 (SEQ ID NO: 17) /#265 (SEQ ID NO: 16). The primers cover the nucleotide sequences corresponding to the following amino acid positions of the heavy chain: MV416 position -19/-13 (signal peptide); MV418 position +1/+7; #265 position +253/+259. Position +1 is the first amino acid of the mature protein.

The cDNA encoding the light chain is amplified using the primer pairs MV417 (SEQ ID NO: 18)/#223 (SEQ ID NO: 19) and MV419 (SEQ ID NO: 20)/#223 (SEQ ID NO: 19). The primers cover the nucleotide sequences corresponding to the following amino-acid positions of the light chain: MV417 position -20/-14 (signal peptide); MV419 position +1/+7; #223 position +210/+215. This approach permitted to make two independent PCR amplifications for each immunoglobulin chain, resulting in two independently established DNA sequences.

Results and Discussion

The cloned PCR products coding for the heavy and light chain from two hybridomas (110-7 and 110-28, see Table 4 above) are characterized by DNA sequencing. Five and six independent sequences are used to assemble the light and heavy chain sequences. The light chain cDNAs are all identical and cover the entire coding sequence (amino acid position -20 to +215). The heavy chain cDNAs had 2 different mismatches in one cDNA each. These are excluded from the final sequence, which extends from the initiation codon to the end of the hinge region after the constant domain 1 (amino acid position -19 to +238). The sequences for both hybridomas are identical. The cDNA obtained from hybridoma 110-28 is selected and used for all further expression work. SEQ ID NO: 7 (cDNA of heavy chain of AIN457), SEQ ID NO: 8 (amino acid sequence of heavy chain of AIN457), SEQ ID NO: 9 (cDNA of light chain of AIN457) and SEQ

56
57

Table 11: Nucleotide and amino-acid sequence of the heavy chain
The amino-acid sequence coding for the variable domain is bold and underlined. The oligonucleotide primers used for cloning and sequencing are indicated.

MF416 ACCATGGAATGGGGCTGAGCTGGGTTTCCCTGTGTGCTATTTAGAGGTGTCCACTGT
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TGGTACCTTAACCCCGACTCGACCCAAAGGAACACGATTAATACTTCCACAGGTGACA

T H E L G L S W V F L V A I L E G V E C -

MF418 GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CTCCAGGTCAACCACTTCAGACCCCTCCGAGCCAGGTGAGACCCCCAGGGACTCTGAG

H V Q L V E S G G G L V Q F G G S L R L -

TCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTAGTAACTATGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
AGGACACGTGAGGACTTAAGTGGAAATCATTGATTAAGTACTTACCCAGCCGTCGA

S C A A S G F T F S H Y W H H W V R Q A -

CCAGGGAAAGGGCTGGATGGGTGGCCGCCATAAACCAAGATGGAGTGGAAATACTAT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
GGTCCCTTTCCGACCTCACCACCGGCGGATTTGGTTCTACCTTCACTCTTTATGATA

P G E G L E W Y A A I H Q D G S E K Y Y -

GTGGGCTCTGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAAAGCCAGAACTCACTGTAT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CACCGAGACACTTCCCGCTAAGTGGTAGAGGTCTCTGTGCGGTTCTTGAGTGACATA

V G S V E G R F T I S R D H A K N S L Y -

MF432 CTGCAATGAAACGGCTGAGAGTCAAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGTAGGGACTAT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GACGTTTACTTGTGAGACTCTCAGCTCTGTGCGACACATAATGACACACTCCCTGATA

L Q H N S L R V E D T A V Y Y C V R D Y -

TACGATATTTGACCGATTAATACATCCACTATTGGTACTTGAATCTCTGGGGCCGTGGC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
ATGCTATAAACTGGCTAATAATGTAGGTGATAACCATGAAGCTGAGACCCCGGCACCG

Y D I L T D Y Y I H Y W Y F D L W G R G -

57
58

MY433 ACCCTGGTCACTGTCTCTCCAGCCCTCCACCAAGGCCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC
421 -----+-----+-----+-----+-----+ 480

MY434 TGGGACCAATGACAGAGGAGTGGGAGGTGGTTCCCGGGTAGCCAGAGGCGGACCGTGGG

F L V F V S S A S T K G P S V F P L A P -

TCTCCAGAGACACTCTCTGGGGCACAGCGCCCTGGGCTCCCTGGTCAAGGACTACTTC
481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540

AGGAGGTTCTCGTGGAGACCCCCGTGTCCCGGGACCCGACCGACCAATTCTCTGATGAG

S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F -

CCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAAGCGCGTGCACACCTTC
541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600

GGGCTTGGCCACTGCCACAGCACCTTGAGTCCGCGGGACTGTTCCCGCACGTGTGGAG

P E P V T V S W N S G A L T S G V N T F -

CGGCGTGTCTTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGGGTGGTGAAGCTGGCCCTCC
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660

GGCCGACAGGATGTCAAGGAGTCTGTAGATGAGGGGATGCTGTCCACCACTGGCACGGGAGG

P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S -

AGCAGCTTGGGCACCCGAGCCTACATCTGCACAGTGAATCAAGCCCGCAACACCAAG
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720

MY435 TGTTGGAACCCGTGGGTCTGGATGTAGACGTTGCACCTAGTGTTCGGGTGTTGTGGTTC

S S L G T Q T Y I C N V N N K P S N T K -

GTGACAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAACTCAGACATGCCCAACCTGCCCA
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780

#268 CACCTGTTCCTCAACTCGGGTTAGGACCTGTTTGAAGTGTGACGGGTGGCACGGGT

V D K R V N P K S C D K T E T C P P C P -

TAA

781 --- 783

ATT

*

Example 4: Three-dimensional structure of the Fab fragment of the anti human IL-17A monoclonal antibody AIN457

In order to determine the conformation of the Complementarity-Determining Regions (CDR's) and the structure of the antigen-binding site of AIN457, the Fab fragment is generated, crystallized and its X-ray structure is determined by protein crystallography.

Method: The Fab fragment of NVP-AIN457 is produced by papain cleavage from the whole antibody and purified by protein A chromatography followed by size-exclusion chromatography. The purified material is then concentrated by ultrafiltration to 20mg/ml in 10mM Tris-HCl pH 7.4, 25mM NaCl, 5mM TCEP. Crystals are grown by the technique of vapor diffusion in hanging drops at 19°C, from 2.0M ammonium sulfate, 5% PEG 400, 0.1M Na MES pH 6.5. They are in space group $P2_12_12_1$ with unit cell dimensions $a=90.3\text{\AA}$, $b=106.7\text{\AA}$, $c=131.4\text{\AA}$ and 2 Fab molecules per asymmetric unit. Prior to X-ray data collection, a single crystal of AIN457 Fab is cross-linked with glutaraldehyde using the method of Lusty (J. Appl. Cryst. (1999) 32, 106-112) and then transferred to a solution containing 2.0M Li_2SO_4 , 2% PEG 400, and 0.1M Na MES pH 6.5. The crystal is subsequently mounted in a cryo-loop and flash-frozen for data collection at 95K. 180 diffraction images corresponding to 1.0deg oscillation each are recorded. The diffraction data are processed with the HKL program suite. The structure is determined to 2.5Å resolution by molecular replacement. The structure is then refined by torsion angle dynamics and energy minimization using the program CNX.

Results: Two AIN457 Fab molecules are present in the asymmetric unit of the crystal, with the H-CDR3 loop of both Fab molecules involved in protein-protein contacts to the H-CDR3 loop of symmetry-related Fabs. The two Fab molecules show different elbow angles but have otherwise essentially identical CDR loop conformations (see Table 12 for amino acid sequence of the CDR loops). The H-CDR1 loop adopts the expected H1:1 canonical structure, while the conformation of the H-CDR2 loop matches that of canonical structure H2:3A. The H-CDR3 loop of the AIN457 antibody is exceptionally long, comprising 18 residues between Kabat positions 94 (Arg H98) and 101 (Asp H115). It shows the typical bulged torso structure stabilized by a salt bridge between the Arg side-chain in position 94 (Arg H98) and the Asp carboxylate group in position H101 (Asp H115), and by an H-bonded interaction between the side-chain of Trp H117 and the main-chain carbonyl group of Phe H114. The head of the H-CDR3 loop has the structure of a

long, twisted beta-hairpin with a second beta-bulge at its base and a type I' beta-turn at its apex. A striking feature of the AIN457 H-CDR3 loop is its very high content in aromatic residues: 6 tyrosines, 2 tryptophanes, 1 phenylalanine. Since all other CDR loops contribute 1 more tyrosine each, the antigen-combining site of AIN457 possesses 11 tyrosines in total. The conformations of the L-CDR1 and L-CDR2 loops correspond to canonical structures L1:6 and L2:1, respectively. In contrast to H-CDR3, the L-CDR3 loop is short (6 residues) and shows the commonly observed canonical structure L3:1, with a cis-proline at its tip (Pro L96), a glutamine at Kabat position 90 (Gln L91) and a threonine at Kabat position 97 (Thr L98). However, a very unusual feature of the AIN457 L-CDR3 loop is the presence of a cysteine residue after the cis-proline (Cys L97). The side-chain of Cys L97 is at the bottom of a shallow depression located at the V_L-V_H interface and lined by residues Trp H112, Trp H47 and Tyr L92.

Table 12:

Light-chain		
L-CDR1	Kabat definition	R-A-S-Q-S-V-S-S-S-Y-L-A
	Chothia/ X-ray definition	R-A-S-Q-S-V-S-S-S-Y-L-A
L-CDR2	Kabat definition	G-A-S-S-R-A-T
	Chothia/ X-ray definition	G-A-S-S-R-A-T
L-CDR3	Kabat definition	Q-Q-Y-G-S-S-P-C-T
	Chothia/ X-ray definition	Q-Q-Y-G-S-S-P-C-T
Heavy-chain		
H-CDR1	Kabat definition	N-Y-W-M-N
	Chothia/ X-ray definition	G-F-T-F-S-N-Y-W-M-N
o H-CDR2	Kabat definition	A-I-N-Q-D-G-S-E-K-Y-Y-V-G-S-V-K-G
	Chothia/ X-ray definition	A-I-N-Q-D-G-S-E-K-Y-Y
H-CDR3	Kabat definition	D-Y-Y-D-I-L-T-D-Y-Y-I-H-Y-W-Y-F-D-L

60
61

	Chothia/ X-ray definition	C-V-R-D-Y-Y-D-I-L-T-D-Y-Y-H-Y-W- Y-F-D-L-W-G
--	---------------------------	---

Table 1 : Amino acid sequences of the hypervariable regions of the AIN457 monoclonal antibodies, based on the Kabat definition and as determined by the X-ray analysis, using the approach of Chothia and coworkers. Amino acid highlighted in bold are part of the CDR loops, while those shown in plain style are part of the antibody framework.

CLAIMS

1. An IL-17 binding molecule which is capable of inhibiting the activity of 1 nM human IL-17 at a concentration of less than 5 nM by 50%, said inhibitory activity is measured on IL-6 production induced by hu-IL-17 in human dermal fibroblasts.
2. An IL-17 binding molecule comprising both heavy (V_H) and light chain (V_L) variable domains; said IL-17 binding molecule comprises at least one antigen binding site comprising:
 - a) an immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1, CDR2 and CDR3, said CDR1 having the amino acid sequence SEQ ID NO:1, said CDR2 having the amino acid sequence SEQ ID NO:2, and said CDR3 having the amino acid sequence SEQ ID NO:3 or direct CDR equivalents thereof; and
 - b) an immunoglobulin light chain variable domain (V_L) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1', CDR2' and CDR3', said CDR1' having the amino acid sequence SEQ ID NO:4, said CDR2' having the amino acid sequence SEQ ID NO:5, and said CDR3' having the amino acid sequence SEQ ID NO:6 or direct CDR' equivalents thereof.
3. An IL-17 binding molecule comprising both heavy (V_H) and light chain (V_L) variable domains; said IL-17 binding molecule comprises at least one antigen binding site comprising:
 - a) an immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1-x, CDR2-x and CDR3-x, said CDR1-x having the amino acid sequence SEQ ID NO:11, said CDR2-x having the amino acid sequence SEQ ID NO:12, and said CDR3-x having the amino acid sequence SEQ ID NO:13 or direct CDR-x equivalents thereof; and
 - c) an immunoglobulin light chain variable domain (V_L) which comprises in sequence hypervariable regions CDR1', CDR2' and CDR3', said CDR1' having the amino acid sequence SEQ ID NO:4, said CDR2' having the amino acid

sequence SEQ ID NO:5, and said CDR3' having the amino acid sequence SEQ ID NO:6 or direct CDR' equivalents thereof.

4. The IL-17 binding molecule according to claim 1, 2 or 3 which is a human antibody.
5. An IL-17 binding molecule which comprises at least one antigen binding site comprising either a first domain having an amino acid sequence substantially homologous to that shown in SEQ ID NO: 8 starting with amino acid at position 1 and ending with amino acid at position 127 or a first domain as described above and a second domain having an amino acid sequence substantially homologous to that shown in SEQ ID NO: 10, starting with amino acid at position 1 and ending with amino acid at position 109.
6. A DNA construct encoding an IL-17 binding molecule according to any of claims 1 to 5.
7. A DNA construct comprising a DNA molecule which is substantially homologous to either SEQ ID NO: 7 or a direct DNA_H equivalent thereof ;or SEQ ID NO: 9 or a direct DNA_L equivalent thereof.
8. A DNA construct comprising 2 DNA molecules of which one is substantially homologous to SEQ ID NO: 7 or a direct DNA_H equivalent thereof and the other substantially homologous to SEQ ID NO: 9 or a direct DNA_L equivalent thereof.
9. An expression vector able to replicate in a prokaryotic or eukaryotic cell line which comprises at least one DNA construct according to claims 6, 7 or 8.
10. A process for the product of an IL-17 binding molecule which comprises (i) culturing an organism which is transformed with an expression vector according to claim 9 and (ii) recovering the IL-17 binding molecule from the culture.
11. The use of an IL-17 binding molecule according to claims 1 to 5, for the manufacture of a medicament.

63
64

12. The use of an IL-17 binding molecule according to claims 1 to 5, for the manufacture of a medicament for the treatment of an IL-17 mediated disease or disorder.
13. The use of an IL-17 binding molecule according to claims 1 to 5, for the treatment of osteoarthritis, rheumatoid arthritis osteoporosis and other inflammatory arthritides.
14. A method for the treatment of an IL-17 mediated disease or disorders in a patient in need thereof, which comprises administering to the patient an effective amount of an IL-17 binding molecule according to claims 1 to 5.
15. A pharmaceutical composition comprising an antibody to IL-17 according to claims 1 to 5, in combination with a pharmaceutically acceptable excipient, diluent or carrier.

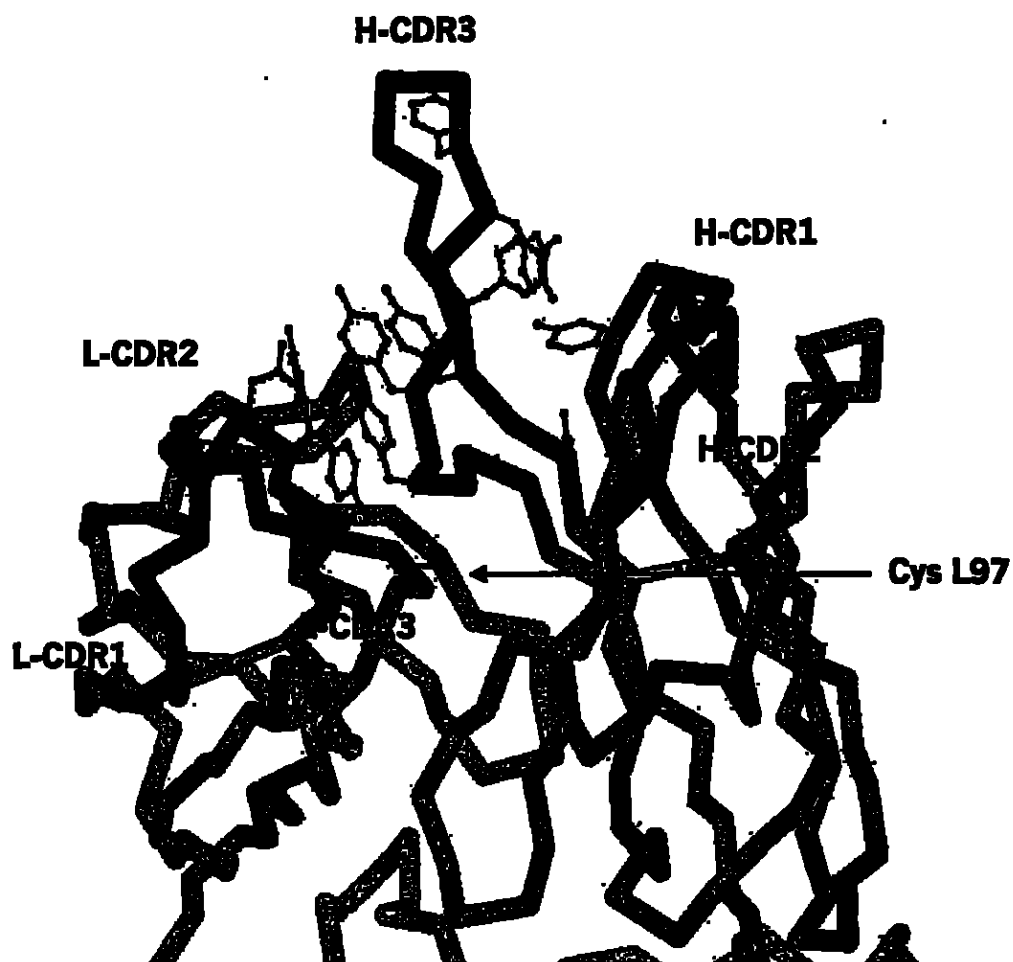


Figure 1. X-ray structure of AIN457 Fab

Close-up view of the variable domains of the AIN457 Fab (C α trace) with complementarity-determining regions highlighted. All tyrosine side-chains contributed by the CDR loops are shown, to illustrate the fact that the antigen-combining site of AIN457 is exceptionnally rich in tyrosine residues. The side-chain of Cys L97, at the V_L-V_H interface, is also shown (arrow).

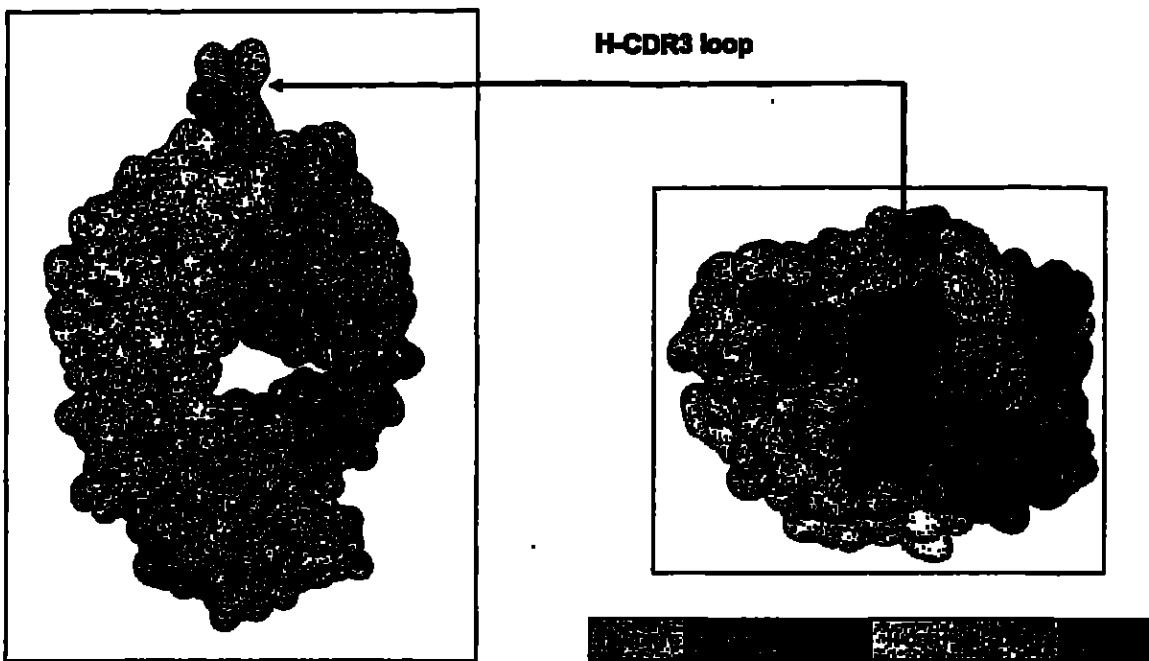


Figure 2. X-ray structure of AIN457 Fab, overall view

Van der Waals surface representation of AIN457 Fab. The light and heavy chain are coloured light and dark grey, respectively. CDR loops are highlighted in different colours. Note the presence of the very loop H-CDR3 loop protruding out of the antigen-combining site of the antibody.

SEQUENCE LISTING

<110> Novartis AG

<120> Organic Compound

<130> 4-33392P1

<160> 23

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> CDR1 region of AIN457

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(5)

<223> CDR1 = hypervariable region 1 of heavy chain of AIN457

<400> 1

Asn Tyr Trp Met Asn

1

5

67
68

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR2 of AIN457

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1) .. (17)
<223> CDR2 = hypervariable region 2 of heavy chain of AIN457

<400> 2

Ala	Ile	Asn	Gln	Asp	Gly	Ser	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Val	Gly	Ser	Val	Lys
1				5				10						15	

Gly

<210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR3 of AIN457

<220>

68
69

<221> DOMAIN

<222> (1)..(18)

<223> CDR3 = hypervariable region 3 of heavy chain of AIN457

<400> 3

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

Asp Leu

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> CDR1' of AIN457

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(12)

<223> CDR1' = hypervariable region 1 of light chain of AIN457

<400> 4

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

69
70

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR2' of AIN457

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(7)
<223> CDR2' = hypervariable region 2 of light chain AIN457

<400> 5

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR3' of AIN457

<220>
<221> DOMAIN
<222> (1)..(9)
<223> CDR3' = hypervariable region 3 of light chain AIN457

70
71

<400> 6

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Cys Thr

1

5

<210> 7

<211> 381

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(381)

<223> DNA of heavy chain domain of AIN457

<400> 7

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

48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

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

96

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20

25

30

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

144

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

35

40

45

72

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

192

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

50

55

60

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

240

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

ctg caa atg aac agc ctg aga gtc gag gac aag got gtg tat tac tgt

288

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

85

90

95

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

336

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

100

105

110

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

381

Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

125

<210> 8

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

72
73

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

125

<210> 9

<211> 327

<212> DNA

73
74

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(327)

<223> DNA of variable part of light chain of AIN457

<400> 9

gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg
48

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

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc
96

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc
144

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt
192

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag
240

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

7A
75

cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca cag
288

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

tgc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa cga
327

Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 10

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> CDR1-x of AIN457

<220>

<221> DOMAIN

<222> (1)..(10)

<223> CDR1-x = hypervariable domain x of heavy chain of AIN457

<400> 11

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Met Asn
1 5 10

<210> 12

<211> 11

76
77

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> CDR2-x of AIN457

<220>

<221> domain

<222> (1)..(11)

<223> CDR2-x = hypervariable domain of heavy chain x of AIN457

<400> 12

Ala Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr

1

5

10

<210> 13

<211> 23

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> CDR3-x of AIN457

<220>

<221> domain

<222> (1)..(23)

<223> CDR3-x = hypervariable domain x of heavy chain AIN457

<400> 13

Cys Val Arg Asp Tyr Tyr Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Ile His Tyr
1 5 10 15

Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Primer for cloning of heavy chain of AIN457

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(20)

<223> MV432

<400> 14

gactattacg atatttttgac

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> primer for cloning heavy chain of AIN457

28
29

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(20)

<223> MV433

<400> 15

gcctccacca agggcccatc

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> primer for cloning heavy chain of AIN457

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(20)

<223> MV434

<400> 16

tggttccogg gtagccagaa

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

79
80

<213> artificial

<220>

<223> primer for cloning of heavy chain of AIN457

<220>

<221> primer_bind

<222> (1) .. (20)

<223> MV435

<400> 17

ccacctgttc tctcaactcg

20

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> PCR of AIN457 heavy chain

<220>

<221> primer_bind

<222> (1) .. (24)

<223> MV416

<400> 18

accatggaat tggggctgag ctgg

24

80
81

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> PCR of AIN457 heavy chain

<220>

<221> primer_bind

<222> (1) .. (26)

<223> #265

<400> 19

gagtgtgtac gggtaggcacg ggtatt

26

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> PCR of AIN457 heavy chain

<220>

<221> primer_bind

<222> (1) .. (21)

<223> MV418

81
82

<400> 20

gaggtgcaat tggaggagtc t

21

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> PCR of AIN457 light chain

<220>

<221> primer_bind

<222> (1) .. (24)

<223> MV417

<400> 21

accatggaaa cccagcgga gctt

24

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> PCR of AIN457 light chain

<220>

82
83

<221> primer_bind

<222> (1)..(22)

<223> #223

<400> 22

gaagttgtac cctctcaca to

22

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> PCR of AIN457 light chain

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(21)

<223> MV419

<400> 23

gaaattgtgt tgacgcagtc t

21

ANTICUERPOS ANTAGONISTAS DE IL-17

Descripción de la invención

Esta invención se refiere a una molécula de enlace de IL-17, en particular un anticuerpo para IL-17 humana, más preferiblemente un anticuerpo humano para IL-17 humana (también denominada IL-17A), y al uso de estos anticuerpos en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por IL-17.

La IL-17, una citoquina derivada de células-T presente, por ejemplo, en artritis reumatoide (RA), actúa como una citoquina pro-inflamatoria, en particular en conjunto con IL-1 y TNF- α (Chabaud M. y Miossec P (1999) *Arthritis Rheum.* 42, 963-970; Awane M. y colaboradores (1999) *J. Immunol* 162, 5337-5344). La IL-17 induce la producción de MMP, y disminuye la TIMP (Jovanovic DV. y colaboradores (2001) *J. Rheumatol.* 28, 712-718), y el bloqueo de IL-1 e IL-17 tiene un efecto sinérgico sobre la inflamación y la destrucción del hueso *in vivo* (Chabaud M. y Miossec (2001) *Arthritis Rheum.* 44, 1293-1303). La producción inapropiada o excesiva de IL-17 está asociada con la patología de diferentes enfermedades y trastornos, tales como artritis reumatoide (Witowski y colaboradores, 2004 *Cell Mol. Life Sci.* 61:567-579), osteoartritis, aflojamiento de los implantes óseos, rechazo de trasplante agudo (Antonysamy y colaboradores, 1999, *J. Immunol* 162, 577-584; van Kooten y colaboradores, 1998, *J. Am. Soc. Nephrol* 9, 1526-1534), septicemia, choque séptico o

84
85

endotóxico, alergias, asma (Molet y colaboradores, 2001, *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, 430-438), pérdida ósea, psoriasis (Teunissen y colaboradores, 1998, *J. Invest. Dermatol.* 111, 645-649), isquemia, esclerosis sistémica (Kurasawa y colaboradores, 2000, *Arthritis Rheum.* 43, 2455-2463), embolia, y otros trastornos inflamatorios. Se han propuesto los anticuerpos para IL-17 con el fin de utilizarse en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por IL-17; ver, por ejemplo, la Publicación Internacional Número WO 95/18826, y la discusión en su introducción.

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

De conformidad con lo anterior, la invención proporciona una molécula de enlace de IL-17, la cual comprende un sitio de enlace de antígeno que comprende cuando menos un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3, teniendo la CDR1 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 (N-Y-W-M-N), teniendo la CDR2 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 (A-I-N-Q-D-G-S-E-K-Y-Y-V-G-S-V-K-G), y teniendo la CDR3 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 (D-Y-Y-D-I-L-T-D-Y-Y-I-H-Y-W-Y-F-D-L); o sus equivalentes de CDR directos.

De acuerdo con lo anterior, la invención también

86
85

proporciona una molécula de enlace de IL-17, la cual comprende cuando menos un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), que comprende, en secuencia, las secuencias hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', teniendo la
5 CDR1' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4 (R-A-S-Q-S-V-S-S-S-Y-L-A), teniendo la CDR2' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5 (G-A-S-S-R-A-T), y teniendo la CDR3' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6 (Q-Q-Y-G-S-S-P-P-C-T), o sus equivalentes de CDR' directos.

10 En otra modalidad de la invención, la invención proporciona una molécula de enlace de IL-17, la cual comprende un sitio de enlace de antígeno que comprende cuando menos un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1-x,
15 CDR2-x, y CDR3-x, teniendo la CDR1-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11 (G-F-T-F-S-N-Y-W-M-N), teniendo la CDR2-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12 (A-I-N-Q-D-G-S-E-K-Y-Y), y teniendo la CDR3-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:13 (C-V-R-D-Y-Y-D-I-L-T-D-Y-Y-I-H-Y-W-Y-F-D-L-W-G); o sus equivalentes de CDR-x
20 directos.

Además, la invención también proporciona una molécula de enlace de IL-17, la cual comprende ambos dominios variables de cadena pesada (V_H) y de cadena ligera (V_L); la molécula de
25 enlace de IL-17 comprende cuando menos un sitio de enlace de

antígeno que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3, teniendo la CDR1
5 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, teniendo la CDR2 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, y teniendo la CDR3 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3, o sus equivalentes de CDR directos; y

b) un dominio variable de cadena ligera de
10 inmunoglobulina (V_L), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', teniendo la CDR1' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, teniendo la CDR2' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, y teniendo la CDR3' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID
15 NO:6, o sus equivalentes de CDR' directos.

Más aún, la invención también proporciona una molécula de enlace de IL-17 que comprende ambos dominios variables de cadena pesada (V_H) y de cadena ligera (V_L); la molécula de enlace de IL-17 comprende cuando menos un sitio de enlace de
20 antígeno que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1-x, CDR2-x, y CDR3-x, teniendo la CDR1-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11,
25 teniendo la CDR2-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID

NO:12, y teniendo la CDR3-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:13, o sus equivalentes de CDR-x directos; y

b) un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', teniendo la CDR1' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, teniendo la CDR2' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, y teniendo la CDR3' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6, o sus equivalentes de CDR' directos.

A menos que se indique de otra manera, cualquier cadena de polipéptido se describe en la presente por tener una secuencia de aminoácidos empezando en la extremidad N-terminal, y finalizando en la extremidad C-terminal. Cuando el sitio de enlace antígeno comprende ambos dominios V_H y V_L , éstos se pueden localizar sobre la misma molécula de polipéptido, o de preferencia, cada dominio puede estar sobre una cadena diferente, siendo el dominio V_H parte de una cadena pesada de inmunoglobulina o fragmento de la misma, y siendo el V_L parte de una cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de la misma.

"Molécula de enlace de IL-17" significa cualquier molécula capaz de enlazarse al antígeno IL-17, ya sea solo o asociado con otras moléculas. La reacción de enlace se puede demostrar mediante métodos convencionales (ensayos cualitativos) incluyendo, por ejemplo, un ensayo de enlace, un ensayo de competencia, o un bioensayo, para determinar la inhibición del

enlace de IL-17 con su receptor, o cualquier clase de ensayos de enlace, con referencia a una prueba de control negativo en donde se utilice un anticuerpo de una especificidad no relacionada pero del mismo isotipo, por ejemplo un anticuerpo anti-CD25 (ver también el Ejemplo 1).

Los ejemplos de las moléculas de enlace de antígeno incluyen los anticuerpos producidos por células-B o hibridomas, y los anticuerpos quiméricos, injertados con CDR, o humanos, o cualquier fragmento de los mismos, por ejemplo F(ab')₂ y fragmentos Fab, así como los anticuerpos de una sola cadena o de un solo dominio.

Un anticuerpo de una sola cadena consiste en los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo covalentemente enlazado por un enlazador peptídico que consiste usualmente en 10 a 30 aminoácidos, de preferencia de 15 a 25 aminoácidos. Por consiguiente, esta estructura no incluye la parte constante de las cadenas pesada y ligera, y se cree que el separador de péptidos pequeño debe ser, menos antigénico que una parte constante entera. "Anticuerpo quimérico" significa un anticuerpo en donde las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera, o ambas, son de origen humano, mientras que los dominios variables de ambas cadenas pesada y ligera son de origen no humano (por ejemplo, de murino), o son de origen humano pero derivadas a partir de un anticuerpo humano diferente. "Anticuerpo injertado con CDR" significa un anticuerpo

en donde las regiones hipervariables (CDRs) se derivan a partir de un anticuerpo donador, tal como un anticuerpo no humano (por ejemplo, de murino), o de un anticuerpo humano diferente, mientras que todas o sustancialmente todas las otras partes de la inmunoglobulina, por ejemplo las regiones constantes y las partes altamente conservadas de los dominios variables, es decir, las regiones de estructura, se derivan a partir de un anticuerpo aceptor, por ejemplo un anticuerpo de origen humano. Sin embargo, un anticuerpo injertado con CDR puede contener unos cuantos aminoácidos de la secuencia donadora en las regiones de estructura, por ejemplo en las partes de las regiones de estructura adyacentes a las regiones hipervariables. "Anticuerpo humano" significa un anticuerpo en donde las regiones constantes y variables de ambas cadenas pesada y ligera son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a las secuencias de origen humano, no necesariamente a partir del mismo anticuerpo, e incluyen los anticuerpos producidos por ratones, en donde los genes de las partes variables y constantes de inmunoglobulina de murino han sido reemplazados por sus contrapartes humanas, por ejemplo como se describe en términos generales en las Patentes Números 0546073 B1, USP 5545806, USP 5569825, USP 5625126, USP 5633425, USP 5661016, USP 5770429, EP 0 438474 B1, y EP 0 463151 B1.

Las moléculas de enlace de IL-17 particularmente preferidas de la invención son anticuerpos humanos, en especial

el anticuerpo AIN457 como se describe posteriormente en la presente, en los Ejemplos 1 y 2.

Por consiguiente, en los anticuerpos quiméricos preferidos, los dominios variables de ambas cadenas pesada y ligera son de
5 origen humano, por ejemplo aquéllas del anticuerpo AIN457, que se muestran en la SEQ ID NO:10 (= dominio variable de cadena ligera, es decir, aminoácidos 1-109 de la SEQ ID NO:10), y en la SEQ ID NO:8 (= dominio variable de cadena pesada, es decir, aminoácidos 1 a 27 de la SEQ ID NO:8). Los dominios de la
10 región constante de preferencia también comprenden dominios de región constante humana adecuados, por ejemplo como se describen en "Sequences of Proteins of Immunological interest", Kabat E.A. y colaboradores, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Servicio de Salud Pública,
15 Instituto Nacional de Salud.

Las regiones hipervariables pueden estar asociadas con cualquier clase de regiones de estructura, aunque de preferencia son de origen humano. Las regiones de estructura adecuadas se describen en Kabat E.A. y colaboradores, *ibid*. La estructura de
20 cadena pesada preferida es una estructura de cadena pesada humana, por ejemplo aquélla del anticuerpo AIN457. Consiste en la secuencia, por ejemplo, de las regiones FR1 (aminoácidos 1 a 30 de la SEQ ID NO:8), FR2 (aminoácidos 36 a 49 de la SEQ ID NO:8), FR (aminoácidos 67 a 98 de la SEQ ID NO:8), y FR4
25 (aminoácidos 117 a 127 de la SEQ ID NO:8). Tomando en

consideración de las regiones hipervariables determinadas de AIN457 mediante análisis de rayos-X, otra estructura de cadena pesada preferida consiste en la secuencia de las regiones FR1-x (aminoácidos 1 a 25 de la SEQ ID NO:8), FR2-x (aminoácidos 36 a 49 de la SEQ ID NO:8), FR3-x (aminoácidos 65 a 95 de la SEQ ID NO:8), y FR4 (aminoácidos 119 a 127 de la SEQ ID NO:8). De una manera similar, la estructura de cadena ligera consiste, en secuencia, en las regiones FR1' (aminoácidos 1 a 23 de la SEQ ID NO:10), FR2' (aminoácidos 36 a 50 de la SEQ ID NO:10), FR3' (aminoácidos 58 a 89 de la SEQ ID NO:10), y FR4' (aminoácidos 99 a 109 de la SEQ ID NO:10).

De conformidad con lo anterior, la invención también proporciona una molécula de enlace de IL-17, la cual comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno que comprende ya sea un primer dominio que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada a la SEQ ID NO:8, empezando con el aminoácido en la posición 1, y finalizando con el aminoácido en la posición 127, ó bien un primer dominio como se describe anteriormente, y un segundo dominio que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la mostrada en la SEQ ID NO:10, empezando con el aminoácido en la posición 1, y finalizando con el aminoácido en la posición 109.

Típicamente se desarrollan anticuerpos monoclonales reproducidos contra una proteína que se encuentre naturalmente en todos los seres humanos, en un sistema no humano, por

ejemplo en ratones, y como tales, son típicamente proteínas no humanas. Como una consecuencia directa de esto, un anticuerpo xenogénico producido por un hibridoma, cuando se administra a seres humanos, provoca una respuesta inmune indeseable, la cual es mediada predominantemente por la parte constante de la inmunoglobulina xenogénica. Esto limita claramente el uso de estos anticuerpos, debido a que no pueden administrarse durante un período de tiempo prolongado. Por consiguiente, se prefiere en particular utilizar anticuerpos de una sola cadena, de un solo dominio quiméricos, injertados con CDR, o en especial humanos, que no tengan probabilidades de provocar una respuesta alogénica sustancial cuando se administren a seres humanos.

En vista de lo anterior, una molécula de enlace de IL-17 más preferida de la invención se selecciona a partir de un anticuerpo anti-IL-17 humano, el cual comprende cuando menos:

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

b) una cadena ligera de inmunoglobulina o fragmento de

la misma, la cual comprende: (i) un dominio variable que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables, y opcionalmente también las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', o sus equivalentes de CDR0' directos, y (ii) la parte
5 constante o fragmento de la misma de una cadena ligera humana, teniendo la CDR1' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, teniendo la CDR2' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, y teniendo la CDR3' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6.

10 De una manera alternativa, se puede seleccionar una molécula de enlace de IL-17 de la invención a partir de una molécula de enlace de una sola cadena, la cual comprende un sitio de enlace de antígeno, que comprende:

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

20 b) un segundo dominio que comprende las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', o sus equivalentes de CDR' directos, teniendo la CDR1' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, teniendo la CDR2' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, y teniendo la CDR3' la secuencia de
25 aminoácidos de la SEQ ID NO:6; y

c) un enlazador peptídico que se enlaza ya sea a la extremidad N-terminal del primer dominio y a la extremidad C-terminal del segundo dominio, o bien a la extremidad C-terminal del primer dominio y a la extremidad N-terminal del segundo dominio.

Como es bien sabido, los cambios menores en una secuencia de aminoácidos, tales supresión, adición, o sustitución de uno, unos cuantos, o inclusive varios aminoácidos, pueden conducir a una forma alélica de la proteína original que tenga propiedades sustancialmente idénticas.

Por consiguiente, el término "sus equivalentes de CDR directos" significa las moléculas de enlace de IL-17 que comprenden, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1_i, CDR2_i, y CDR_i (en lugar de CDR1, CDR2, y CDR3), en donde:

(i) la región hipervariable CDR1_i difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR1 como se muestra en la SEQ ID NO:1; y

(ii) la región hipervariable CDR2_i difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR2 como se muestra en la SEQ ID NO:2; y

(iii) la región hipervariable CDR3_i difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:3; y

(iv) esta molécula que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1_i, CDR2_i, y CDR3_i, es capaz de

inhibir la actividad de la IL-17 humana 1 nM (= 30 nanogramos/mililitro) en una concentración de 50 nM, de preferencia de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, y de una manera muy preferible de 5 nM de esta molécula por el 50 por ciento, y esta actividad inhibidora se mide sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

De una manera similar, el término "sus equivalentes de CDR-x directos", significa las moléculas de enlace de IL-17 que comprenden, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1₁-x, CDR2₁-x, y CDR3₁-x (en lugar de CDR1-x, CDR2-x, y CDR3-x), en donde:

(v) la región hipervariable CDR1₁-x difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR1-x, como se muestra en la SEQ ID NO:11; y

(vi) la región hipervariable CDR2₁-x difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR2-x, como se muestra en la SEQ ID NO:12; y

(vii) la región hipervariable CDR3₁-x difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR3-x, como se muestra en la SEQ ID NO:13; y

(viii) esta molécula que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1-x, CDR2-x, y CDR3₁-x, es capaz de inhibir la actividad de la IL-17 humana 1 nM (= 30 nanogramos/mililitro) en una concentración de 50 nM, de preferencia 20 nM, más preferiblemente 10 nM, y de una manera

muy preferible 5 nM de esta molécula por el 50 por ciento, y esta actividad inhibidora se mide sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

De una manera similar, el término "sus equivalentes de CDR' directos" significa un dominio que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', en donde:

(i) la región hipervariable CDR1' difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR1' como se muestra en la SEQ ID NO:4; y

10 (ii) la región hipervariable CDR2' difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR2' como se muestra en la SEQ ID NO:5; y

(iii) la región hipervariable CDR3' difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR3' como se muestra en la SEQ ID NO:6; y

15 (iv) esta molécula que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', es capaz de inhibir la actividad de la IL-17 humana 1 nM (= 30 nanogramos/mililitro) en una concentración de 50 nM, de preferencia de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, y de una manera muy preferible de 5 nM de esta molécula por el 50 por ciento, y esta actividad inhibidora se mide sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

De una manera alternativa, una molécula de enlace de IL-17 de la invención puede ser una molécula de enlace de IL-17 que

25

comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno el cual comprende cuando menos un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), que comprende, en secuencia:

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

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

la molécula de enlace de IL-17 que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1-x, CDR2-x, y CDR3-x es capaz de inhibir la actividad de la IL-17 humana 1 nM (= 30 nanogramos/mililitro) en una concentración de 50 nM, de
20 preferencia de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, y de una manera muy preferible de 5 nM de esta molécula por el 50 por ciento, y esta actividad inhibidora se mide sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

De una manera similar, una molécula de enlace de IL-17 de
25 la invención puede ser una molécula de enlace de IL-17 que

comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno, el cual comprende cuando menos un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), que comprende, en secuencia:

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

b) las regiones hipervariables CDR1₁-x, CDR2₁-x, y CDR3₁-x, en donde la región hipervariable CDR1₁-x difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR1-x como se muestra en la SEQ ID NO:11; la
10 región hipervariable CDR2₁-x difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente un aminoácido, de la región hipervariable CDR2-x como se muestra en la SEQ ID NO:12; y la región hipervariable CDR3₁-x difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR3-x como se muestra
15 en la SEQ ID NO:13; y

la molécula de enlace de IL-17 que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1₁-x, CDR2₁-x, y CDR3₁-x, es capaz de inhibir la actividad de la IL-17 humana 1 nM (= 30 nanogramos/mililitro) en una concentración de 50 nM, de
20 preferencia de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, y de una manera muy preferible de 5 nM de esta molécula por el 50 por ciento, y esta actividad inhibidora se mide sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

De una manera similar, una molécula de enlace de IL-17 de
25 la invención puede ser una molécula de enlace de IL-17 que

comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno, el cual comprende cuando menos un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), que comprende, en secuencia:

a) las regiones hipervariables CDR'1 (SEQ ID NO:4),
5 CDR'2 (SEQ ID NO:5), y CDR'3 (SEQ ID NO:6); o

b) las regiones hipervariables CDR1'₁, CDR2'₁, y CDR3'₁,
en donde la región hipervariable CDR1'₁ difiere por 3, de
preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región
hipervariable CDR'1 como se muestra en la SEQ ID NO:4; la
10 región hipervariable CDR2'₁ difiere por 3, de preferencia 2, más
preferiblemente un aminoácido, de la región hipervariable CDR'2
como se muestra en la SEQ ID NO:5; y la región hipervariable
CDR'3₁ difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1
aminoácido, de la región hipervariable CDR'3 como se muestra en
15 la SEQ ID NO:6; y

la molécula de enlace de IL-17 que comprende, en
secuencia, las regiones hipervariables CDR'1₁, CDR'2₁, y CDR'3₁,
es capaz de inhibir la actividad de la IL-17 humana 1 nM (= 30
nanogramos/mililitro) en una concentración de 50 nM, de
20 preferencia de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, y de una
manera muy preferible de 5 nM de esta molécula por el 50 por
ciento, y esta actividad inhibidora se mide sobre la producción de
IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

De una manera alternativa, una molécula de enlace de IL-
25 17 de la invención puede ser una molécula de enlace de IL-17 que

comprende ambos dominios variables de cadena pesada (V_H) y de cadena ligera (V_L), y esta molécula de enlace de IL-17 comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno, el cual comprende:

5 a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1 (SEQ ID NO:1), CDR2 (SEQ ID NO:2), y CDR3 (SEQ ID NO:3); y

10 un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1' (SEQ ID NO:4), CDR2' (SEQ ID NO:5), y CDR3' (SEQ ID NO:6); o

15 b) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1_i, CDR2_i, y CDR3_i, las regiones hipervariables de la región hipervariable CDR1_i, CDR2_i, y CDR3_i, en donde la región hipervariable CDR1_i, difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR1 como se muestra en la SEQ ID NO:1, la región hipervariable CDR2_i, difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR2 como se muestra en la SEQ ID NO:2; y la región hipervariable CDR3_i difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:3; y

25 un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina

(V_L), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1'_i, CDR2'_i, y CDR3'_i, en donde la región hipervariable CDR1'_i, difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR'1
5 como se muestra en la SEQ ID NO:4; la región hipervariable CDR'2_i, difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR'2 como se muestra en la SEQ ID NO:5; y la región hipervariable CDR'3_i, difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región
10 hipervariable CDR'3, como se muestra en la SEQ ID NO:6; y

la molécula de enlace de IL-17 definida en b) que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1_i, CDR2_i, y CDR3_i, es capaz de inhibir la actividad de la IL-17 humana 1 nM (= 30 nanogramos/mililitro) en una concentración de
15 50 nM, de preferencia de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, y de una manera muy preferible de 5 nM de esta molécula por el 50 por ciento, y esta actividad inhibidora se mide sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

20 De una manera alternativa, una molécula de enlace de IL-17 de la invención puede ser una molécula de enlace de IL-17 que comprende ambos dominios variables de cadena pesada (V_H) y de cadena ligera (V_L), y la molécula de enlace de IL-17 comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno, el cual comprende:

25 a) un dominio variable de cadena pesada de

inmunoglobulina (V_H), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1-x (SEQ ID NO:11), CDR2-x (SEQ ID NO:12), y CDR3-x (SEQ ID NO:13); y

5 un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1' (SEQ ID NO:4), CDR2' (SEQ ID NO:5), y CDR3' (SEQ ID NO:6); o

b) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), el cual comprende, en secuencia, las
10 regiones hipervariables CDR1₁-x, CDR2₁-x, y CDR3₁-x, las regiones hipervariables de la región hipervariable CDR1₁-x, CDR2₁-x, y CDR3₁-x, y la región hipervariable CDR1₁-x, difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR1-x como se muestra en la SEQ ID
15 NO:11, la región hipervariable CDR2₁-x, difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR2-x como se muestra en la SEQ ID NO:12; y la región hipervariable CDR3₁-x, difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR3-x
20 como se muestra en la SEQ ID NO:13; y

un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1'₁, CDR2'₁, y CDR3'₁, en donde la región hipervariable CDR'₁, difiere por 3, de preferencia 2, más
25 preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR'1

como se muestra en la SEQ ID NO:4; la región hipervariable CDR'2_I, difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR'2 como se muestra en la SEQ ID NO:5; y la región hipervariable CDR'3_I, difiere por 3, de preferencia 2, más preferiblemente 1 aminoácido, de la región hipervariable CDR'3, como se muestra en la SEQ ID NO:6; y

la molécula de enlace de IL-17 definida en b), que comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1_I, CDR2_I, y CDR3_I, CDR'1_I, CDR'2_I, y CDR'3_I, es capaz de inhibir la actividad de la IL-17 humana 1 nM (= 30 nanogramos/mililitro) en una concentración de 50 nM, de preferencia de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, y de una manera muy preferible de 5 nM de esta molécula por el 50 por ciento, y la actividad inhibidora se mide sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

La inhibición del enlace de IL-17 con su receptor se puede probar de una manera conveniente en diferentes ensayos, incluyendo los ensayos descritos posteriormente en la presente, en el texto. El término "hasta el mismo grado" significa que la referencia y las moléculas equivalentes exhiben, sobre una base estadística, una actividad inhibidora de IL-17 esencialmente idéntica en uno de los ensayos referidos en la presente (ver el Ejemplo 1). Por ejemplo, las moléculas de enlace de IL-17 de la invención normalmente tienen IC₅₀s para la inhibición de IL-17 humana sobre la producción de IL-6 inducida por IL-17 humana en

fibroblastos dérmicos humanos, que están dentro de ± 5 , es decir, debajo de 10 nM, más preferiblemente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, ó 2 nM de aquélla de, de preferencia sustancialmente la misma que, la IC_{50} de la molécula de referencia correspondiente, cuando se
5 ensaya como se describe en el Ejemplo 1.

De una manera alternativa, el ensayo utilizado puede ser un ensayo de inhibición competitiva del enlace de IL-17 por los receptores de IL-17 solubles (por ejemplo, las construcciones R/Fc de IL-17 humana del Ejemplo), y las moléculas de enlace de
10 IL-17 de la invención.

De una manera más preferible, el anticuerpo IL-17 humano comprende cuando menos:

a) una cadena pesada que comprende un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica
15 a la mostrada en la SEQ ID NO:8, empezando con el aminoácido en la posición 1, y finalizando con el aminoácido en la posición 127, y la parte constante de una cadena pesada humana; y

b) una cadena ligera que comprende un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica
20 a la mostrada en la SEQ ID NO:10, empezando con el aminoácido en la posición 1, y finalizando con el aminoácido en la posición 109, y la parte constante de una cadena pesada humana.

La parte constante de una cadena pesada humana puede ser del tipo γ_1 , γ_2 , γ_3 , γ_4 , μ , α_1 , α_2 , δ , ó ϵ , de preferencia del tipo γ , más preferiblemente del tipo γ_1 , mientras que la parte
25

constante de una cadena ligera humana puede ser del tipo κ ó λ (que incluye los subtipos λ_1 , λ_2 , y λ_3), pero de preferencia es del tipo κ . Las secuencias de aminoácidos de todas estas partes constantes se dan en Kabat y colaboradores (*supra*).

5 También se incluyen los conjugados de las moléculas de enlace de la invención, por ejemplo los conjugados de enzimas o toxinas o radioisótopos, dentro del alcance de la invención.

"Polipéptido", si no se especifica de otra manera en la presente, incluye cualquier péptido o proteína que comprenda
10 aminoácidos unidos unos con otros mediante enlaces peptídicos, que tengan una secuencia de aminoácidos empezando en la extremidad N-terminal y finalizando en la extremidad C-terminal. De preferencia, el polipéptido de la presente invención es un anticuerpo monoclonal, más preferiblemente es un anticuerpo
15 monoclonal quimérico (también denominado V-injertado) o humanizado (también denominado CDR-injertado), y de una manera muy preferible, un anticuerpo completamente humano que se puede obtener, por ejemplo, mediante la tecnología ejemplificada en el Ejemplo 1. El anticuerpo monoclonal
20 humanizado (CDR-injertado) o completamente humano, puede o no incluir mutaciones adicionales introducidas en las secuencias de estructura (CFR) del anticuerpo aceptor.

Un derivado funcional de un polipéptido, como se utiliza en la presente, incluye una molécula que tiene una actividad
25 biológica cualitativa en común con un polipéptido de la presente

invención, es decir, que tiene la capacidad para enlazarse a la IL-17 humana. Un derivado funcional incluye fragmentos y análogos de péptidos de un polipéptido de acuerdo con la presente invención. Los fragmentos comprenden las regiones dentro de la

5 secuencia de un polipéptido de conformidad con la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada. El término "derivado" se utiliza para definir variantes de secuencias de aminoácidos, y las modificaciones covalentes de un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, de una

10 secuencia especificada. Los derivados funcionales de un péptido de conformidad con la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada, por ejemplo de la región hipervariable de la cadena ligera y pesada, de preferencia tienen cuando menos una homología de secuencia global de aproximadamente el 65 por

15 ciento, más preferiblemente de cuando menos aproximadamente el 75 por ciento, todavía de una manera más preferible de cuando menos aproximadamente el 85 por ciento, y muy preferiblemente de cuando menos el 95, 96, 97, 98, 99 por ciento, con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de acuerdo con la

20 presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada, y retienen sustancialmente la capacidad para enlazarse con la IL-17 humana, o, por ejemplo, para neutralizar la producción de IL-6 de los fibroblastos dérmicos humanos inducidos por IL-17.

El término "modificación covalente", incluye las

25 modificaciones de un polipéptido de acuerdo con la presente

invención, por ejemplo de una secuencia especificada; o un fragmento de la misma, con un agente de derivación orgánico, proteináceo, o no proteináceo, fusiones con secuencias de polipéptidos heterólogas, y modificaciones posteriores a la traducción. Los polipéptidos con modificación covalente, por ejemplo, de una secuencia especificada, todavía tendrán la capacidad para enlazarse con la IL-17 humana, o, por ejemplo, para neutralizar la producción de IL-6 de los fibroblastos dérmicos humanos inducidos por IL-17, mediante reticulación.

Tradicionalmente se introducen las modificaciones covalentes mediante la reacción de los residuos de aminoácidos objetivos con un agente de derivación orgánico que sea capaz de reaccionar con los lados seleccionados o los residuos terminales, o mediante mecanismos de anclaje de las modificaciones posteriores a la traducción que funcionan en células huéspedes recombinantes seleccionadas. Ciertas modificaciones posteriores a la traducción son el resultado de la acción de las células huéspedes recombinantes sobre el polipéptido expresado. Los residuos de glutaminilo y asparaginilo con frecuencia son desamidados posteriormente a la traducción hasta los residuos de glutamilo y aspartilo correspondientes. De una manera alternativa, estos residuos son desaminados bajo condiciones ligeramente ácidas. Otras modificaciones posteriores a la traducción incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de los grupos hidroxilo de los residuos de serilo,

tirosina, o treonilo, la metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina, e histidina, ver, por ejemplo, T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86 (1983). Las modificaciones covalentes, por ejemplo, incluyen a las proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada, y sus variantes de secuencias de aminoácidos, tales como inmunoadhesinas, y las fusiones N-terminales para las secuencias de señales heterólogas.

"Homología", con respecto a un polipéptido nativo y su derivado funcional, se define en la presente como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata, que son idénticos a los residuos de un polipéptido nativo correspondiente, después de alinear las secuencias y de introducir huecos, si es necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de homología, y sin considerar cualquiera sustituciones conservadoras como parte de la identidad de la secuencia. No se interpretará que las extensiones N- ó C-terminales, ni las inserciones, reduzcan la identidad o la homología. Los métodos y los programas de computadora para la alineación son bien conocidos.

"Aminoácidos" se refieren a todos los L- α -aminoácidos que se presentan naturalmente, por ejemplo, e incluyendo, los D-aminoácidos. Los aminoácidos se identifican mediante cualquiera de las designaciones de una sola letra o de tres letras bien

conocidas.

El término "variante de secuencia de aminoácidos" se refiere a las moléculas con algunas diferencias en sus secuencias de aminoácidos, comparándose con un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. Las variantes de secuencias de aminoácidos de un polipéptido de conformidad con la presente invención, por ejemplo, de una secuencia especificada, todavía tendrán la capacidad para enlazarse a la IL-17 humana, o, por ejemplo, para neutralizar la producción de IL-6 de los fibroblastos dérmicos humanos inducidos por IL-17. Las variantes de sustitución son aquellas que tienen cuando menos un residuo de aminoácido removido, y un aminoácido diferente insertado en su lugar en la misma posición en un polipéptido de acuerdo con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. Estas sustituciones pueden ser individuales, en donde solamente se haya sustituido un aminoácido en la molécula, o pueden ser múltiples, en donde se hayan sustituidos dos o más aminoácidos en la misma molécula. Las variantes de inserción son aquellas con uno o más aminoácidos insertados inmediatamente adyacentes a un aminoácido en una posición particular en un polipéptido de conformidad con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada. Inmediatamente adyacente a un aminoácido significa que está conectado ya sea al grupo funcional α -carboxilo o bien α -amino del aminoácido. Las variantes de

H10

supresión son aquéllas con uno o más aminoácidos en un polipéptido de conformidad con la presente invención, por ejemplo de una secuencia especificada, removidos. Ordinariamente, las variantes de supresión tendrán uno o dos aminoácidos suprimidos

5 en una región particular de la molécula.

Una molécula de enlace de IL-17 de la invención se puede producir mediante técnicas de ADN recombinante. En vista de esto, se deben construir una o más moléculas de ADN que codifiquen a la molécula de enlace, se colocan bajo secuencias

10 de control apropiadas, y se transfieren a un organismo huésped adecuado para la expresión.

De una manera muy general, de conformidad con lo anterior, se proporcionan:

(i) moléculas de ADN que codifican una molécula de

15 enlace de IL-17 de un solo dominio de la invención, una molécula de enlace de IL-17 de una sola cadena de la invención, una molécula de enlace de IL-17 que comprende una cadena pesada y ligera como se define en la presente, o fragmentos de una molécula de enlace de IL-17 de la invención; y

20 (ii) el uso de las moléculas de ADN de la invención para la producción de una molécula de enlace de IL-17 de la invención por medios recombinantes.

De conformidad con lo anterior, la invención proporciona una molécula de ADN que codifica una molécula de enlace de IL-

25 17 como se describe en lo anterior.

Además, la invención proporciona una construcción de ADN que comprende una molécula de ADN que es sustancialmente homóloga a las SEQ ID NO:7 ó SEQ ID NO:9.

5 Adicionalmente, la invención proporciona una construcción de ADN que comprende dos moléculas de ADN, de las cuales una es sustancialmente homóloga a la SEQ ID NO:7 ó es un equivalente de ADN_H directo de la misma, y la otra es sustancialmente homóloga a la SEQ ID NO:9, ó es un equivalente de ADN_L directo de la misma.

10 El presente estado de la técnica es tal que el experto en este campo puede sintetizar las moléculas de ADN de la invención dada la información proporcionada en la presente, es decir, las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables y las regiones de ADN que las codifican. Por ejemplo, en la Patente
15 Europea Número EPA 239 400, se describe un método para construir un gen de dominio variable, y se puede resumir brevemente como sigue: se clona un gen que codifica un dominio variable de un anticuerpo monoclonal de cualquier especificidad. Se determinan los segmentos de ADN que codifican las regiones
20 de estructura e hipervariables, y se remueven los segmentos de ADN que codifiquen las regiones hipervariables, de tal manera que se fusionen entre sí los segmentos de ADN que codifiquen las regiones de estructura con sitios de restricción en las uniones. Los sitios de restricción se pueden generar en las posiciones
25 apropiadas mediante mutagénesis de la molécula de ADN

mediante procedimientos convencionales. Se preparan casetes de CDR sintéticos de doble cadena mediante síntesis de ADN de acuerdo con las secuencias que codifican para las SEQ ID NO:1 (CDR1), SEQ ID NO:2 (CDR2), SEQ ID NO:3 (CDR3), SEQ ID NO:4 (CDR1'), SEQ ID NO:5 (CDR2'), SEQ ID NO:6 (CDR3'), SEQ ID NO:11 (CDR1-x), SEQ ID NO:12 (CDR2-x), SEQ ID NO:13 (CDR3-x). Estos casetes son provistos con extremos pegajosos, de tal manera que se puedan ligar en las uniones de la estructura.

Además, no es necesario tener acceso al ARNm desde una línea celular de hibridoma productora con el objeto de obtener una construcción de ADN que codifique para las moléculas de enlace de IL-17 de la invención. Por consiguiente, la Solicitud del TCP Número WO 90/07861 da instrucciones completas para la producción de un anticuerpo mediante técnicas de ADN recombinante, dada solamente la información escrita con respecto a la secuencia de nucleótido del gen. El método comprende la síntesis de un número de oligonucleótidos, su amplificación mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa, y su empalme para dar la secuencia de ADN deseada.

Los vectores de expresión que comprenden un promotor adecuado o genes que codifican las partes constantes de cadena pesada y ligera están públicamente disponibles. Por consiguiente, una vez que se prepara una molécula de ADN de la invención, se puede transferir de una manera conveniente a un vector de

expresión apropiado. También se pueden preparar moléculas de ADN que codifican anticuerpos de una sola cadena mediante métodos convencionales, por ejemplo, como se describe en la Publicación Internacional Número WO 88/1649.

5 En analogía al caso para los equivalentes de CDR, el término "equivalentes de ADN_H directos de la misma" significa que es una primera construcción de ADN que codifica una cadena pesada o fragmento de la misma de una molécula de enlace de IL-17 de la invención, y que comprende:

10 a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende de manera alternada las regiones de estructura e hipervariables, siendo las regiones hipervariables, en secuencia, CDR1_i, CDR2_i, y CDR3_i, la CDR1_i es cuando menos 50 por ciento homóloga, de preferencia cuando menos 60, 70, 80, 85, ó 90 por
15 ciento homóloga, más preferiblemente cuando menos 95 por ciento homóloga a la región hipervariable CDR1 como se muestra en la SEQ ID NO:1, la CDR2_i es cuando menos 50 por ciento homóloga, de preferencia cuando menos 60, 70, 80, 85, ó 90 por
20 ciento homóloga, y de una manera más preferible cuando menos 95 por ciento homóloga a la región hipervariable CDR2 como se muestra en la SEQ ID NO:2; y la CDR3_i es cuando menos 50 por ciento homóloga, de preferencia cuando menos 60, 70, 80, 85, ó
25 90 por ciento homóloga, de una manera más preferible cuando menos 95 por ciento homóloga a la región hipervariable CDR3 como se muestra en la SEQ ID NO:3; empezando esta primera

parte con un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable, y finalizando con un codón que codifica el último aminoácido del dominio variable; y

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

10 c) codificando esta construcción de ADN un polipéptido que es capaz, ya sea solo o en combinación con otro polipéptido, de inhibir la actividad de la IL-17 humana 1 nM (= 30 nanogramos/mililitro) en una concentración de 50 nM, de preferencia de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, y de una
15 manera muy preferible de 5 nM de esta molécula por el 50 por ciento, y la actividad inhibidora se mide sobre la producción de IL-6 inducida por la hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

De una manera similar, el término "equivalentes de ADN_H-x directos de la misma", significan una primera construcción de
20 ADN alternativa que codifica una cadena pesada o fragmento de la misma, de una molécula de enlace de IL-17 de la invención, y que comprende:

a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende, de una manera alternada, las regiones de estructura
25 e hipervariables, siendo estas regiones hipervariables, en

secuencia CDR1₁-x, CDR2₁-x, y CDR3₁-x; la CDR1₁-x es cuando
menos 50 por ciento homóloga, de preferencia cuando menos 60,
70, 80, 85, ó 90 por ciento homóloga, de una manera más
preferible cuando menos 95 por ciento homóloga a la región
5 hipervariable CDR1 como se muestra en la SEQ ID NO:11; la
CD23₁-x es cuando menos 50 por ciento homóloga, de preferencia
cuando menos 60, 70, 80, 85, ó 90 por ciento homóloga, de una
manera más preferible cuando menos 95 por ciento homóloga a la
región hipervariable CDR2 como se muestra en la SEQ ID NO:12;
10 y la CDR3₁-x es cuando menos 50 por ciento homóloga, de
preferencia cuando 60, 70, 80, 85, ó 90 por ciento homóloga, de
una manera más preferible cuando menos 95 por ciento homóloga
a la región hipervariable CDR3 como se muestra en la SEQ ID
NO:13; empezando esta primera parte con un codón que codifica
15 el primer aminoácido del dominio variable, y finalizando con un
codón que codifica el último aminoácido del dominio variable; y

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

c) codificando esta construcción de ADN un polipéptido
que es capaz, ya sea solo o en combinación con otro polipéptido,
25 de inhibir la actividad de la IL-17 humana 1 nM (= 30

nanogramos/mililitro) en una concentración de 50 nM, de preferencia de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, y de una manera muy preferible de 5 nM de esta molécula por el 50 por ciento, y la actividad inhibidora se mide sobre la producción de IL-6 inducida por la hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

De preferencia, estas construcciones de ADN codifican un dominio variable que comprende, de una manera alternada, regiones de estructura e hipervariables, siendo las regiones hipervariables, en secuencia CDR1, CDR2, y CDR3, teniendo la CDR1 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, teniendo la CDR2 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, y teniendo la CDR3 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3. De una manera más preferible, estas construcciones de ADN codifican un dominio variable que comprende, de una manera alternada, regiones de estructura e hipervariables, siendo estas regiones hipervariables, en secuencia, CDR1-x, CDR2-x, y CDR3-x, teniendo la CDR1-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11, teniendo la CDR2-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12, y teniendo la CDR3-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:13. De una manera más preferible, esta primera parte codifica un dominio variable que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:8, empezando con el aminoácido en la posición 1, y finalizando con el aminoácido en la posición 127. De una manera más preferible, la primera parte

117
418

tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:7, empezando con el nucleótido en la posición 1, y finalizando con el nucleótido en la posición 381. También de una manera preferible, la segunda parte codifica la parte constante de una

5 cadena pesada humana, más preferiblemente la parte constante de la cadena $\gamma 1$ humana. Esta segunda parte puede ser un fragmento de ADN de origen genómico (que comprenda intrones), o un fragmento de ADNc (sin intrones).

De una manera similar, el término "equivalentes de ADN_L directos de la misma" significa una segunda construcción de ADN

10 que codifica una cadena ligera o fragmento de la misma, de una molécula de enlace de IL-17 de la invención, y que comprende:

a) una primera parte que codifica un dominio variable que comprende de manera alternada las regiones de estructura e

15 hipervariables, siendo las regiones hipervariables CDR3_L', y opcionalmente CDR1_L', y CDR2_L'; la CDR1_L' es cuando menos 50 por ciento homóloga, de preferencia cuando menos 60, 70, 80, 85, ó 90 por ciento homóloga, más preferiblemente cuando menos 95 por ciento homóloga a la región hipervariable CDR1 como se

20 muestra en la SEQ ID NO:4; la CDR2_L' es cuando menos 50 por ciento homóloga, de preferencia cuando menos 60, 70, 80, 85, ó 90 por ciento homóloga, más preferible cuando menos 95 por ciento homóloga a la región hipervariable CDR2' como se muestra en la SEQ ID NO:5; y la CDR3_L' es cuando menos 50 por

25 ciento homóloga, de preferencia cuando menos 60, 70, 80, 85, ó 90 por

118
119

ciento homóloga, y de una manera muy preferible cuando menos 95 por ciento homóloga a la región hipervariable CDR3' como se muestra en la SEQ ID NO:6; empezando esta primera parte con un codón que codifica el primer aminoácido del dominio variable, y
5 finalizando con un codón que codifica el último aminoácido del dominio variable; y

b) una segunda parte que codifica una parte constante de cadena ligera o fragmento de la misma, que empieza con un codón que codifica el primer aminoácido de la parte constante de
10 la cadena ligera, y finaliza con un codón que codifica el último aminoácido de la parte constante o fragmento de la misma, seguido por un codón de paro; y

c) codificando esta construcción de ADN para un polipéptido que es capaz, ya sea solo o en combinación con otro
15 polipéptido, de inhibir la actividad de la IL-17 humana 1 nM (= 30 nanogramos/mililitro) en una concentración de 50 nM, de preferencia de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, y de una manera muy preferible de 5 nM de esta molécula por el 50 por ciento, y la actividad inhibidora se mide sobre la producción de
20 IL-6 inducida por la hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

De preferencia, esta segunda construcción de ADN codifica un dominio variable que comprende, de una manera alternativa, regiones de estructura e hipervariables, siendo las regiones hipervariables, en secuencia, CDR1', CDR2', y CDR3', teniendo la
25 CDR1' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, teniendo

la CDR2' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, y
teniendo la CDR3' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID
NO:6. De una manera más preferible, esta primera parte de la
segunda construcción de ADN codifica un dominio variable que
5 tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la
secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:10,
empezando con el aminoácido en la posición 1, y finalizando con
el aminoácido en la posición 109. De una manera más preferible,
la primera parte tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la
10 SEQ ID NO:9, empezando con el nucleótido en la posición 1, y
finalizando con el nucleótido en la posición 327. También de
preferencia, la segunda parte codifica la parte constante de una
cadena ligera humana, más preferiblemente la parte constante de
la κ humana.

15 De preferencia, las primera y segunda construcciones de
ADN se utilizarán juntas, pero también se pueden utilizar por
separado.

La invención también incluye moléculas de enlace de IL-17,
en donde se cambian uno o más de los residuos de aminoácidos
20 de la CDR1, CDR2, CDR3, CDR1-x, CDR2-x, CDR3-x, CDR1',
CDR2', ó CDR3', o las estructuras, típicamente sólo unos cuantos
(por ejemplo, de 1 a 4); por ejemplo, mediante mutación, por
ejemplo mutagénesis dirigida al sitio de las secuencias de ADN
correspondientes. La invención incluye las secuencias de ADN
25 que codifican para estas moléculas de enlace de IL-17

cambiadas. En particular, la invención incluye moléculas de enlace de IL-17, en donde se han cambiado uno o más residuos de CDR1' ó CDR2' de los residuos mostrados en las SEQ ID NO:4 (para CDR1') y SEQ ID NO:5 (para CDR2').

5 En las primera y segunda construcciones de ADN, las primera y segunda partes se pueden separar mediante un intrón, y convenientemente se puede localizar un potenciador en el intrón entre las primera y segunda partes. La presencia de este potenciador, que se transcribe pero no se traduce, puede ayudar
10 a tener una transcripción eficiente. En las modalidades particulares, las primera y segunda construcciones de ADN comprenden al potenciador de un gen de cadena pesada convenientemente de origen humano.

 Cada una de las construcciones de ADN se coloca bajo el
15 control de secuencias de control adecuadas, en particular bajo el control de un promotor adecuado. Se puede utilizar cualquier clase de promotor, en el entendido de que se adapte al organismo huésped al que se transferirán las construcciones de ADN para la expresión.

20 El anticuerpo deseado se puede producir en un cultivo celular o en un animal transgénico. Se puede obtener un animal transgénico adecuado de acuerdo con los métodos convencionales, los cuales incluyen microinyección en los huevos de las primera y segunda construcciones de ADN puestas bajo
25 secuencias de control adecuadas, la transferencia de los huevos

así preparados a las hembras pseudo-preñadas apropiadas, y la selección de un descendiente que exprese el anticuerpo deseado.

Cuando se producen las cadenas de anticuerpos en un cultivo celular, primero se deben insertar las construcciones de ADN ya sea en un solo vector de expresión, o bien en dos
5 vectores de expresión separados pero compatibles, prefiriéndose esta última posibilidad.

De conformidad con lo anterior, la invención también proporciona un vector de expresión capaz de replicarse en una
10 línea celular procariótica o eucariótica, la cual comprenda cuando menos una de las construcciones de ADN anteriormente descritas.

Cada vector de expresión que contenga una construcción de ADN, se transfiere entonces a un organismo huésped adecuado. Cuando se insertan por separado las construcciones de
15 ADN sobre dos vectores de expresión, se pueden transferir por separado, es decir, un tipo de vector por célula, o se pueden co-transferir, prefiriéndose esta última posibilidad. Un organismo huésped adecuado puede ser una bacteria, una levadura, o una línea celular de mamífero, prefiriéndose ésta última. De una
20 manera más preferible, la línea celular de mamífero es de origen linfóide, por ejemplo un mieloma, hibridoma, o una célula-B inmortalizada normal, que convenientemente no exprese ninguna cadena pesada o ligera de anticuerpo endógeno.

Para la expresión en células de mamífero, se prefiere que
25 la molécula de enlace de IL-17 que codifique la secuencia, se

integre en el ADN de la célula huésped dentro de un lugar que permita o favorezca un alto nivel de expresión de la molécula de enlace de IL-17. Las células en las que se integre la secuencia que codifique la molécula de enlace de IL-17 en estos lugares favorables, se pueden identificar y seleccionar con base en los niveles de la molécula de enlace de IL-17 que expresen. Se puede utilizar cualquier marcador seleccionable adecuado para la preparación de células huéspedes que contengan la secuencia de codificación de la molécula de enlace de IL-17; por ejemplo, se puede utilizar un sistema de selección de gen dhfr/metotrexato o equivalente. Los sistemas alternativos para la expresión de las moléculas de enlace de IL-17 de la invención incluyen los sistemas de amplificación/selección basados en GS, tales como los descritos en las Patentes Europeas Números EP 0256055 B, EP 0323997, y en la Solicitud de Patente Europea Número 89303964.4.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un proceso para la producción de una molécula de enlace de IL-17, el cual comprende: (i) cultivar un organismo que se transforme con un vector de expresión como se define anteriormente, y (ii) recuperar la molécula de enlace de IL-17 a partir del cultivo.

Para los propósitos de la presente invención, un anticuerpo es "capaz de inhibir el enlace de IL-17 como AIN457" si el anticuerpo es capaz de inhibir el enlace de IL-17 con su receptor sustancialmente hasta el mismo grado que el anticuerpo AIN457,

en donde "hasta el mismo grado" tiene el significado definido anteriormente.

El anticuerpo AIN457 tiene una afinidad de enlace para IL-17 que es más alta que las afinidades previamente reportadas para los anticuerpos anti-IL-17, en particular para cualquier anticuerpo anti-IL-17 humana. Por consiguiente, el AIN457 tiene una constante de equilibrio de disociación K_D para enlazarse con IL-17 de aproximadamente 0.188 ± 0.036 nM (determinado por BIAcore, por ejemplo como se muestra en el Ejemplo 2). Esta alta afinidad de enlace hace que el anticuerpo AIN457 sea particularmente adecuado para aplicaciones terapéuticas.

En la presente descripción, la frase "enfermedad mediada por IL-17" abarca todas las enfermedades y condiciones médicas en las que la IL-17 tenga un papel, ya sea directa o indirectamente, en la enfermedad o en la condición médica, incluyendo la causa, desarrollo, progreso, persistencia, o patología de la enfermedad o condición.

En la presente descripción, los términos "tratamiento" o "tratar" se refieren tanto al tratamiento profiláctico como preventivo, así como al tratamiento curativo o modificador de la enfermedad, incluyendo el tratamiento del paciente en riesgo de contraer la enfermedad o del que se sospeche que ha contraído la enfermedad, así como de los pacientes que estén enfermos o hayan sido diagnosticados por sufrir de una enfermedad o condición médica, e incluye la supresión de la recurrencia clínica.

Las moléculas de enlace de IL-17 definidas anteriormente, que tienen especificidad de enlace para la IL-17 humana, en particular los anticuerpos que son capaces de inhibir el enlace de IL-17 con su receptor; y los anticuerpos para IL-17 que son
5 capaces de inhibir la actividad de la IL-17 humana 1 nM (= 30 nanogramos/mililitro) en una concentración de 50 nM, de preferencia de 20 nM, más preferiblemente de 10 nM, y de una manera muy preferible de 5 nM de esta molécula por el 50 por ciento, en donde la actividad inhibidora se mide sobre la
10 producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en fibroblastos dérmicos humanos, son referidas posteriormente en la presente como los Anticuerpos de la Invención.

De preferencia, los Anticuerpos de la Invención son anticuerpos humanos, más preferiblemente el anticuerpo AIN457,
15 o sus equivalentes directos.

Los Anticuerpos de la Invención bloquean los efectos de la IL-17 sobre sus células objetivas, y por lo tanto, se indican para utilizarse en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por IL-17. Estas y otras actividades farmacológicas de
20 los Anticuerpos de la Invención se pueden demostrar en métodos de prueba convencionales, por ejemplo, como se describen en seguida:

Neutralización de la producción de Interleucina-6 dependiente de IL-17 por parte de los fibroblastos humanos primarios:

25 La producción de IL-6 en los fibroblastos humanos

primarios (dérmicos) depende de la IL-17 (Hwang SY y colaboradores, (2004) Arthritis Res. Ther; 6:R120-128.

En resumen, se estimulan los fibroblastos dérmicos humanos con IL-17 recombinante en la presencia de diferentes concentraciones del Anticuerpo de la Invención o del receptor de IL-17 humano con la parte Fc. Se utiliza el anticuerpo quimérico anti-CD25 Simulect® (basiliximab) como un control negativo. Se toma el sobrenadante después de un estímulo de 16 horas, y se ensaya para determinar la IL-6 mediante ELISA. Los Anticuerpos de la Invención típicamente tienen IC₅₀s para la inhibición de la producción de IL-6 (en la presencia de IL-17 humana 1 nM) de aproximadamente 50 nM o menos (por ejemplo, de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 50 nM) cuando se prueba como anteriormente, es decir, se mide la actividad inhibidora sobre la producción de IL-6 inducida por hu-IL-17 en los fibroblastos dérmicos humanos. De preferencia, los Anticuerpos de la Invención tienen una IC₅₀ para la inhibición de la producción de IL-6 como se define en lo anterior, de aproximadamente 20 nM ó menos, más preferiblemente de aproximadamente 10 nM ó menos, de una manera más preferible de aproximadamente 5 nM ó menos, muy preferiblemente de aproximadamente 2 nM ó menos, y de una forma muy preferible de aproximadamente 1 nM ó menos.

Como se indica en el ensayo anterior, los Anticuerpos de la Invención bloquean potentemente los efectos de la IL-17. De

170
+17

conformidad con lo anterior, los Anticuerpos de la Invención tienen utilidad farmacéutica como sigue:

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

Por ejemplo, los Anticuerpos de la Invención se pueden
10 utilizar para el tratamiento de receptores de trasplantes de corazón, pulmón, corazón-pulmón combinados, hígado, riñón, páncreas, piel o córnea, incluyendo rechazo de aloinjerto o rechazo de xenoinjerto, y para la prevención de la enfermedad del injerto contra el huésped, tal como en seguida de trasplante de
15 médula ósea, y arterioesclerosis asociada con trasplante de órganos.

Los Anticuerpos de la Invención son particularmente útiles para el tratamiento, la prevención, o la disminución de enfermedad autoinmune y de condiciones inflamatorias, en
20 particular condiciones inflamatorias con una etiología que incluya un componente autoinmune, tales como artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis crónica progresiva, y artritis deformans) y enfermedades reumáticas, incluyendo condiciones inflamatorias y enfermedad reumáticas que involucren pérdida
25 ósea, dolor inflamatorio, espondiloartropatías incluyendo

espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, artritis reactiva, artritis psoriática, y artritis enterofatis, hipersensibilidad (incluyendo tanto hipersensibilidad de las vías respiratorias como hipersensibilidad dérmica), y alergias. Las enfermedades

5 autoinmunes específicas para las cuales se pueden emplear los Anticuerpos de la Invención incluyen trastornos hematológicos autoinmunes (incluyendo, por ejemplo, anemia hemolítica, anemia aplástica, anemia de glóbulos rojos puros, y trombocitopenia idiopática), lupus eritematoso sistémico, trastornos inflamatorios

10 de los músculos, policondritis, esclerodoma, granulomatosis de Wegener, dermatomiositis, hepatitis activa crónica, miastenia gravis, psoriasis, síndrome de Steven-Johnson, prurito idiopático, enfermedad inflamatoria del intestino autoinmune (incluyendo, por ejemplo, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, y síndrome de

15 intestino irritable), oftalmopatía endocrina, enfermedad de Graves, sarcoidosis, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, diabetes juvenil (diabetes mellitus tipo I), uveítis (anterior y posterior), queratoconjuntivitis sicca y queratoconjuntivitis vernal, fibrosis pulmonar intersticial, artritis psoriática y

20 glomerulonefritis (con y sin síndrome nefrótico, por ejemplo incluyendo síndrome nefrótico idiopático o nefropatía de cambio mínimo), tumores, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria de la piel y de la córnea, miositis, aflojamiento de implantes óseos, trastornos metabólicos, tales como aterosclerosis, diabetes, y

25 dislipidemia.

/

Los Anticuerpos de la Invención también son útiles para el tratamiento, la prevención, o la disminución de asma, bronquitis, neumoconiosis, enfisema pulmonar, y otras enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias.

5 Los Anticuerpos de la Invención son útiles para el tratamiento de reacciones inflamatorias agudas e hiperagudas indeseables que sean mediadas por IL-17, o que involucren la producción de IL-17, o la promoción de la liberación de TNF por parte de IL-17, por ejemplo infecciones agudas, por ejemplo
10 choque séptico (por ejemplo, choque endotóxico y síndrome de insuficiencia respiratoria de adultos), meningitis, neumonía; y quemaduras severas; y para el tratamiento de caquexia o síndrome de desecho asociado con liberación patológica de TNF, a consecuencia de infección, cáncer, o disfunción de órganos, en
15 especial caquexia relacionada con SIDA, por ejemplo asociada con, o a consecuencia de, infección por VIH.

Los Anticuerpos de la Invención son particularmente útiles para el tratamiento de enfermedades del metabolismo óseo, incluyendo osteoartritis, osteoporosis y otros artríticos
20 inflamatorios, y pérdida ósea en general, incluyendo pérdida ósea relacionada con la edad, y en particular enfermedad periodontal.

Para estas indicaciones, la dosificación apropiada, por supuesto, variará dependiendo, por ejemplo, del Anticuerpo de la Invención particular que se vaya a emplear, del huésped, del
25 modo de administración, y de la naturaleza y severidad de la

condición que se esté tratando. Sin embargo, en el uso profiláctico, en general se indica que se obtienen resultados satisfactorios en dosificaciones de aproximadamente 0.05 miligramos a aproximadamente 10 miligramos por kilogramo de peso corporal, más usualmente de aproximadamente 0.1 miligramos a aproximadamente 5 miligramos por kilogramo de peso corporal. La frecuencia de dosificación para usos profilácticos normalmente estará en el intervalo de aproximadamente una vez por semana hasta aproximadamente una vez cada tres meses, más usualmente en el intervalo de aproximadamente una vez cada dos semanas hasta aproximadamente una vez cada 10 meses, por ejemplo una vez cada cuatro a ocho semanas. El Anticuerpo de la Invención se administra de una manera conveniente parenteralmente, intravenosamente, por ejemplo en la vena anticubital u otra vena periférica, intramuscularmente, o subcutáneamente. Un tratamiento profiláctico típicamente comprende administrar el Anticuerpo de la Invención de una vez al mes a una vez cada dos a tres meses, o con menos frecuencia.

Los Anticuerpos de la Invención se pueden administrar como el único ingrediente activo, o en conjunto con, por ejemplo, como un adyuvante para, o en combinación con, otros fármacos, por ejemplo agentes inmunosupresores o inmunomoduladores, u otros agentes anti-inflamatorios, por ejemplo para el tratamiento o la prevención de las enfermedades mencionadas anteriormente.

Por ejemplo, los Anticuerpos de la Invención se pueden utilizar en combinación con DMARD, por ejemplo sales de oro, sulfasalazina, antimalarias, metotrexato, D-penicilamina, azatloprina, ácido micofenólico, ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus, minociclina, leflunomida, glucocorticoides; un inhibidor de calcineurina, por ejemplo, ciclosporina A ó FK 506; un modulador de la recirculación de linfocitos, por ejemplo FTY720 y análogos de FTY720; un inhibidor de mTOR, por ejemplo rapamicina, 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicina, CCI779, ABT578, AP23573 ó TAFA-93; una ascomicina que tenga propiedades inmunosupresoras, por ejemplo ABT-281, ASM981, etcétera; corticosteroides; ciclofosfamida; azatiopreno; metotrexato; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico; mifenolato-mofetil; 15-desoxi-espergualina, o un homólogo, análogo, o derivado inmunosupresor de la misma; anticuerpos monoclonales inmunosupresores, por ejemplo anticuerpos monoclonales para los receptores de leucocitos, por ejemplo MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD40, CD45, CD58, CD80, CD86 o sus ligandos; otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo una molécula de enlace recombinante que tenga cuando menos una porción del dominio extracelular de CTLA4 o un mutante de la misma, por ejemplo cuando menos una porción de CTLA4 ó un mutante de la misma unido a una secuencia que no sea de proteína CTLA4, por ejemplo CTLA4Ig (por ejemplo designada como ATCC 68629), ó un mutante de la misma, por ejemplo LEA29Y; inhibidores de

moléculas de adhesión, por ejemplo antagonistas de LFA-1, antagonistas de ICAM-1 ó -3, antagonistas de CVAM-4 ó antagonistas de VLA-4; o un agente quimioterapéutico, por ejemplo paclitaxel, gemcitabina, cisplatino, doxorrubicina, ó 5-fluorouracilo; agentes anti-TNF, por ejemplo anticuerpos monoclonales para TNF, por ejemplo infliximab, adalimumab, CDP870, o construcciones receptoras para TNF-RI ó TNF-RII, por ejemplo Etanercept, PEG-TNF-RI; bloqueadores de las citoquinas proinflamatorias, bloqueadores de IL-1, por ejemplo Anakinra ó la trampa de IL-1, AAL160, ACZ 885, bloqueadores de IL-6; bloqueadores de quimiocinas, por ejemplo inhibidores o activadores de proteasas, por ejemplo metaloproteasas, anticuerpos anti-IL-15, anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos anti-CD20, NSAIDs, tales como aspirina o un agente anti-infeccioso (la lista no se limita a los agentes mencionados).

De conformidad con lo anterior, la presente invención proporciona, en todavía un aspecto adicional:

Un método como se define anteriormente, el cual comprende la co-administración, por ejemplo de una manera concomitante o en secuencia, de una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de enlace de IL-17, por ejemplo un Anticuerpo de la Invención, y cuando menos una segunda sustancia de fármaco, siendo esta segunda sustancia de fármaco un fármaco inmunosupresor/-inmunomodulador, anti-inflamatorio, quimioterapéutico, o anti-infeccioso, por ejemplo como se indica

en lo anterior.

O una combinación terapéutica, por ejemplo un estuche terapéutico, que comprenda una cantidad terapéuticamente efectiva de: a) una molécula de enlace de IL-17, por ejemplo un Anticuerpo de la Invención, y b) cuando menos una segunda sustancia seleccionada a partir de un fármaco inmunosupresor/inmunomodulador, anti-inflamatorio, quimioterapéutico, o anti-infeccioso, por ejemplo como se indica en lo anterior. El estuche terapéutico puede comprender instrucciones para su administración.

Cuando los Anticuerpos de la Invención se administran en conjunto con otra terapia inmunosupresora/-inmunomoduladora, anti-inflamatoria, quimioterapéutica, o anti-infecciosa, las dosificaciones del compuesto de combinación co-administrado, por supuesto, variarán dependiendo del tipo de co-fármaco empleado, por ejemplo si es un DMARD, anti-TNF, bloqueador de IL-1, u otros, del fármaco específico empleado, de la condición que se esté tratando, etcétera.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden fabricar de una manera convencional. Una composición de acuerdo con la invención de preferencia se proporciona en una forma liofilizada. Para su administración inmediata, se disuelve en un vehículo acuoso adecuado, por ejemplo agua estéril para inyecciones, o suero fisiológico regulado estéril. Si se considera deseable formar una solución de un mayor volumen para su

administración mediante infusión en lugar de hacerlo como una inyección de bolo, es conveniente incorporar albúmina de suero humano o la propia sangre heparinizada del paciente en el suero en el momento de la formulación. De una manera alternativa, la formulación se da de una forma subcutánea. la presencia de un exceso de esta proteína fisiológicamente inerte previene la pérdida del anticuerpo por su adsorción sobre las paredes del recipiente y la tubería utilizados con la solución para infusión. Si se utiliza albúmina, una concentración adecuada es del 0.5 al 4.5 por ciento en peso de la solución salina. Otras formulaciones comprenden una formulación líquida o liofilizada.

La invención se describe además a manera de ilustración en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Se utilizan ratones transgénicos diseñados para expresar el repertorio de IgG/k humano en lugar del repertorio de inmunoglobulina de murino (Fishwild y colaboradores, 1996, Nat Biotechnol., 14, 845-851), para generar anticuerpos para la IL-17 humana. Las células-B de estos ratones se immortalizan mediante tecnología de hibridoma convencional, y se obtienen células de hibridoma de murino, las cuales secretan el anticuerpo AIN457 de IgG/ k humana.

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

Producción de IL-17 humana recombinante (huIL-17): La

hulL-17 recombinante se produce ya sea en *E. coli* en cuerpos de inclusión y se repliega mediante técnicas convencionales (producida en casa sin vehículo (*E. coli*; Novartis Pharma, lote BM-E3141/98), o bien se compra (sin vehículo, *E. coli*; R&D Systems #317-IL/CF)), o como la proteína secretada y parcialmente glicosilada en HEK.EBNA (hulL-17 recombinante, sin vehículo (IL-17 APP-C6 a partir de células HEK/EBNA transfectadas; Novartis Pharma, lote En.E-3382/82; 0.28 miligramos/mililitro); hulL-17 recombinante, sin vehículo (IL-17 APP-C4 a partir de células HEK/EBNA transfectadas; Novartis Pharma, lote En.E-3382/83; 0.29 miligramos/mililitro)). La última forma proporciona una extensión C-terminal de 4 aminoácidos para una rápida purificación a partir de los sobrenadantes de cultivo mediante cromatografía por Inmunoadfinidad. En este caso, los sobrenadantes de cultivo se cargan sobre una columna del tamaño apropiado, de un anticuerpo anti-marca inmovilizado específico acoplado con Sepharose 4B activada con CNBr en una densidad de 10 miligramos/mililitro de resina, siguiendo las instrucciones del fabricante (Pharmacia). Después del lavado de la línea base con suero regulado con fosfato, se eluye la hulL-17 enlazada con glicina 100 nM, pH de 2.7, e inmediatamente se neutraliza con NaOH diluido.

Acoplamiento de hulL-17 con la hemocianina de *Ilmpete de orificio* (KLH): La hulL-17 producida ya sea en *E. coli* o bien HEK.EBNA, se acopla con KLH preactivada con un exceso de

reticulante homobifuncional de suberato de disuccinimidilo (DSS).
Dicho de una manera breve, 20 miligramos de Inject® Mariculture
KLH liofilizada (Pierce #77600) se reconstituyen con 2 mililitros
de H₂O, para dar una solución de 10 miligramos/mililitro que
5 contiene suero regulado con fosfato (PBS), pH de 7.2. A esta
solución se le agregan 400 microlitros de DSS 250 mM en
sulfóxido de dimetilo (DMSO), y la mezcla se agita durante
aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente (no se disuelve
todo el reactivo, y se forma algún precipitado). Después de una
10 breve centrifugación y filtración (0.45 micras), la solución se
desala luego sobre Sephadex G25 fina (Pharmacia) en suero
regulado con fosfato (velocidad de flujo de 2 mililitros/minuto),
produciendo aproximadamente 11 miligramos de KLH activada a
1.5 miligramos/mililitro (Bradford). 1 mililitro de la KLH activada
15 (1.5 miligramos) se mezcla con 1 mililitro de una solución de 9
miligramos/mililitro en agua de huLL-17 derivada de *E. coli*
liofilizada (lote BM-E3141/98). La solución permanece
transparente, y se incuba durante 2 horas a temperatura
ambiente. La concentración del complejo resultante es de 1.4
20 miligramos/mililitro (medido por Bradford). 1 mililitro de la KLH
activada (1.5 miligramos) se mezcla con 1 mililitro de huLL-17 de
HEK.EBNA huLL-17 (aproximadamente 3 miligramos en agua; lote
En.E-3382/83). La solución permanece transparente, y se incuba
durante 2 horas a temperatura ambiente. La concentración
25 (Bradford) es de 2.9 miligramos/mililitro.

136
127

Inmunización: El ratón genéticamente diseñado 27340 (hembra; MEDAREX Inc. Annandale, NJ), en el que los genes de las partes variable y constante de inmunoglobulina de murino son funcionalmente reemplazados por sus contrapartes humanas (genotipo Tg, código 221100-TgH (CMD)++; TgN(Hco7)11952+; TgH(JKD)++; TgN(KCO5)9272+ (ver también Sherie L. Morrison, 1994, Nature, Volumen 368, páginas 812-813; Nils Lonberg y colaboradores, 1994, Nature, Volumen 368, páginas 856-859), se inmuniza siguiendo el esquema reportado en la Tabla 1.

Tabla 1. Programa de Inmunización.

Día	Fecha	Inmunógeno	Dosis y Vía de Administración
0	07.06.01	hulL-17 (BM-E3141/98) acoplada con KLH mezclada a 1:1 con hulL-17 (BM-E3141/98) en adyuvante Gerbu	25 microgramos de cada una subcutáneamente en dos puntos; volumen total/ratón con adyuvante: 100 microlitros
14	21.06.01 (1er.refuerzo)	hulL-17 (BM-E3141/98) acoplada con KLH mezclada a 1:1 con hulL-17 (En.E-3382/83) acoplada con KLH en adyuvante de Gerbu.	25 microgramos de cada una subcutáneamente en dos puntos; volumen total/-ratón con adyuvante: 100 microlitros.

137
x58

5

10

15

20

25

28	05.07.01 (2° refuerzo)	huIL-17 (BM-E3141/98) mezclada a 1:1 con huIL-17 (En.E-3382/83) en adyuvante de Gerbu.	10 microgramos de cada una subcutánea en dos puntos; volumen total/ratón con adyuvante: 100 microlitros.
35	12.07.01		sueros recolectados para el ELISA
42	19.07.01 (3er.refuerzo)	huIL-17 (BM-E3141/98) mezclada a 1:1 con huIL-17 (En.E-3382/83) acoplada con KLH en adyuvante de Gerbu.	20 microgramos de cada una subcutáneamente en dos puntos; volumen total/-ratón con adyuvante: 100 microlitros.
63	09.08.01 (4° refuerzo)	huIL-17 (BM-E3141/98) acoplada con KLH mezclada a 1:1 con huIL-17 (En.E-3382/83) acoplada con KLH en adyuvante de Gerbu	20 microgramos de cada una subcutáneamente en dos puntos; volumen total/-ratón con adyuvante: 100 microlitros.

138
139

5

10

15

20

91	06.09.01	huIL-17 (BM-E3141/98) mezclada a 1:1 con huIL-17 (En.E.3382/83) en adyuvante de Gerbu.	20 microgramos de cada una subcutáneamente en dos puntos; volumen total/-ratón con adyuvante: 100 microlitros.
99	14.09.01		sueros recolectados para el ELISA.
117	02.10.01	huIL-17 (En.E-3382/83) huIL-17 En.E-3382/83) acoplada con KLH.	10 microgramos/-ratón intravenosa. 10 microgramos/ratón intraperitoneal.
118	03.10.01	huIL-17 (En.E-3382/83) acoplada con KLH	10 microgramos/ratón intraperitoneal.
119	04.10.01	huIL-17 (En.E-3382/83) acoplada con KLH	10 microgramos/ratón intraperitoneal.
120	05.10.01	fusión	

Se obtienen muestras de suero 35 y 99 días después del inicio del protocolo de inmunización, para medir los niveles del

anticuerpo anti-huLL-17 mediante el ensayo inmunosorbente enlazado con enzima (ELISA).

Generación de hibridomas: En el día 120, se sacrifica el ratón 27340 mediante inhalación de CO₂. Las células de bazo
5 totales (1×10^8) se fusionan con las células PAI-0 (5×10^7 células) utilizando PEG 4000. Las células fusionadas se aplican a 720 pozos (1 mililitro/pozo), que contienen una capa alimentadora de células peritoneales de ratón (ratones Balb/c), en un medio HAT (RPMI 1640 conteniendo 2 gramos/litro de bicarbonato de sodio,
10 β -mercaptoetanol 5×10^{-5} M, hipoxantina 10^{-4} M, timidina 1.6×10^{-5} M, aminopterina 4×10^{-7} M, suero de becerro fetal inactivado por calor al 10 por ciento, y 50 microgramos/mililitro de gentamicina). En el día 14, se intercambia el medio HAT con un medio HT, es decir, un medio HAT sin aminopterina. El rastreo se inicia en el
15 día 10, y dura dos semanas. De los 720 pozos iniciales aplicados, 684 pozos (95 por ciento) son positivos para el crecimiento del hibridoma. Los sobrenadantes se recolectan y se rastrean para determinar el anticuerpo monoclonal reactivo con huLL-17 en el ELISA, utilizando tanto huLL-17 derivada de *E. coli* como derivada
20 de HEK/EBNA. 52 pozos primarios califican positivo para la presencia de anticuerpos anti-huLL-17. Se clonan 28 hibridomas, y los restantes se congelan. La clonación se hace en cuatro placas de microtitulación de 96 pozos, en un medio HT, y una capa alimentadora de células peritoneales de ratón. Los hibridomas se
25 aplican a 0.5 células/100 microlitros por pozo. Los pozos se

140
+41

rastrean microscópicamente para determinar el crecimiento, y los positivos se alimentan con 100 microlitros del medio HT. Al día siguiente, se prueban los sobrenadantes para determinar la producción de anticuerpos en un ELISA específico de hUL-17.

5 Después de la clonación, la mayoría de los hibridomas clonados retienen la capacidad para secretar el anticuerpo monoclonal (MAb) específico anti-hUL-17.

Producción y purificación del anticuerpo: Los clones seleccionados se transfieren al medio exento de suero (5

10 mililitros) en matraces de TC (TC: cultivo de tejido) de 25 centímetros cuadrados. Los hibridomas se expanden progresivamente en el medio exento de suero en matraces de cultivo de tejido de 75 centímetros cuadrados y en matraces rodantes. Todos los diferentes anticuerpos monoclonales anti-

15 hUL-17, incluyendo el NVP-AIN457-NX (340-110-28, es decir, número de ratón-número de hibridoma-número de clon) se purifican mediante cromatografía por afinidad con Proteína A. Los sobrenadantes del cultivo se ajustan a un pH de 7.3, y se cargan sobre una columna del tamaño apropiado de Proteína A-

20 Sepharose 4 de flujo rápido (Pharmacia). Después del lavado de la línea base con regulador de fosfato 100 mM, pH de 7.3, los anticuerpos enlazados se eluyen con citrato 50 mM, pH de 2.7, NaCl 140 mM. La fracción eluida se neutraliza inmediatamente (pH de 7.0), y se filtra estéril. La concentración de proteínas se

25 determina mediante absorción a 280 nanómetros, utilizando un

factor de 1.35 Unidades de Absorción (AU)/miligramo.

Actividad Inhibidora del anticuerpo monoclonal anti-huIL-17 sobre la producción de IL-16 inducida por huIL-17 en fibroblastos dérmicos humanos: Se cultivan fibroblastos dérmicos humanos en FBM complementado con suero de becerro fetal al 2 por ciento, insulina (5 microgramos/mililitro), huFGF-básico (0.1 microgramos/mililitro), y gentamicina (50 microgramos/mililitro). Los fibroblastos se separan del plástico utilizando una solución de tripsina/EDTA. Los fibroblastos se distribuyen en placas de microtitulación de 96 pozos, a una densidad de 1×10^4 células/pozo en FBM complementado con suero de becerro fetal al 1 por ciento. Se permite que los fibroblastos se adhieran a las placas durante la noche. A la siguiente mañana, se remueven del medio, y se agregar FBM fresco complementado con suero de becerro fetal al 1 por ciento, huIL-17 (diferentes concentraciones en el intervalo de 30 a 500 nanogramos/mililitro), y sobrenadante de hibridoma (dilución final de 1/5) o anticuerpos purificados, hasta un volumen final de 200 microlitros. Los sobrenadantes del cultivo se recolectan después de una incubación de 24 horas, y se mide la producción de huIL-6 mediante ELISA.

ELISA para la detección de anticuerpos huIL-17: Las placas de microtitulación ELISA se recubren con huIL-17 recombinante (100 microlitros/pozo a 3 microgramos/mililitro; lote BM-E3141/98 ó En.E-3382/82) en suero regulado con fosfato,

142
143

NaN₃ al 0.02 por ciento, y se incuban durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, las placas de microtitulación se bloquean con 300 microlitros de suero regulado con fosfato/albúmina de suero bovino al 2 por ciento/NaN₃ al 0.02 por ciento durante 2 horas a 37°C. Luego las placas se lavan cuatro veces con suero regulado con fosfato/Tween 20 al 0.05 por ciento/NaN₃ al 0.02 por ciento. Se agregan diluciones en suero del ratón 27340 (intervalo de dilución final en el día 35: 1/100 a 1/3200; intervalo de dilución final al día 99: 1/200 a 1/12800; 100 microlitros/pozo), o sobrenadantes de cultivo de hibridomas (dilución final de 1:3; 100 microlitros/pozo). Después de una incubación durante la noche a temperatura ambiente, las placas se lavan cuatro veces con suero regulado con fosfato/Tween 20 al 0.05 por ciento/NaN₃ al 0.02 por ciento. Se agrega un anticuerpo específico de fragmento Fc de ratón anti-hu-IgG conjugado con biotina en una dilución final de 1/20000 (100 microlitros/pozo). Las muestras se dejan reaccionar durante 4 horas a temperatura ambiente. Después de lavarse (cuatro veces), se agrega estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina en una dilución final de 1/8000 (100 microlitros/pozo). Después de 40 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavan de nuevo cuatro veces, y se agrega el sustrato (regulador de fosfato de p-nitrofenilo en dietil-amino, pH de 9.8; 150 microlitros/pozo). Las placas se leen después de 30 ó 45 minutos, dependiendo del desarrollo de la reacción, en un lector de microtitulación (BioRad) utilizando

filtros de 405 y 490 nanómetros.

ELISA para la detección del isotipo del anticuerpo: Para revelar el isotipo del anticuerpo monoclonal, se agregan sobrenadantes de cultivo (100 microlitros; dilución final de 1/5) a los pozos de placas de microtitulación recubiertas con huL-17 (ver anteriormente), y se incuban durante la noche a temperatura ambiente. Después de lavarse (4 veces), se agregan 100 microlitros/pozo de los anticuerpos monoclonales de ratón conjugados con biotina anti-humanos IgG1 (dilución final de 1/1000), IgG2 (dilución final de 1/1000), IgG3 (dilución final de 1/1000), IgG4 (dilución final de 1/2000), ó la cadena ligera κ anti-humana (dilución final de 1/1000) durante 4 horas a temperatura ambiente. Como un control, se utiliza el anticuerpo monoclonal específico de la cadena ligera λ 1 y λ 2 de rata anti-ratón conjugado con biotina (dilución final de 1/1000). Esto es seguido como se describió anteriormente, por lavado y adición de estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (100 microlitros; dilución final de 1/8000). Después de lavar (4 veces), se agrega el sustrato (regulador de fosfato de p-nitrofenilo en dietil-amino; 100 microlitros). Las placas se leen después de 30 ó 45 minutos, dependiendo del desarrollo de la reacción, en un lector de microplacas (Bio-Rad) utilizando filtros de 405 y de 490 nanómetros.

ELISA para la detección de la producción de huL-6: Las placas de microtitulación ELISA se recubren con un anticuerpo

144
145
146

monoclonal de ratón anti-huLL-6 (MAB206 de R&D Systems; 100 microlitros/pozo a 4 microgramos/mililitro) en suero regulado con fosfato, NaN_3 al 0.02 por ciento, y se incuban durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, las placas de

5 microtitulación se bloquean con 300 microlitros de suero regulado con fosfato/albúmina de suero bovino al 2 por ciento/ NaN_3 al 0.02 por ciento durante 2 horas a 37°C. Luego las placas se lavan 4 veces con suero regulado con fosfato/Tween 20 al 0.05 por

10 ciento/ NaN_3 al 0.02 por ciento. Se agregan los sobrenadantes de cultivo de fibroblastos dérmicos humanos (dilución final de 1:3; 100 microlitros/pozo). Para establecer una curva de titulación, se titula la huLL-6 (100 microlitros/pozo) desde de 400 picogramos/mililitro hasta 3.1 picogramos/mililitro en pasos de dilución de 1:2. Después de una incubación durante la noche a

15 temperatura ambiente, las placas se lavan 4 veces con suero regulado con fosfato/Tween 20 al 0.05 por ciento/ NaN_3 al 0.02 por ciento. Se agrega un anticuerpo de cabra anti-huLL-6 conjugado con biotina (BAP206; R&D Systems) (25 nanogramos/mililitro; 100 microlitros/pozo). Las muestras se dejan reaccionar guante 4

20 horas a temperatura ambiente. Después de lavar (4 veces), se agrega estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina en una dilución final de 1/8000 (100 microlitros/pozo). Después de 40 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavan de nuevo 4 veces, y se agrega el sustrato (regulador de fosfato de p-

25 nitrofenilo en dietil-amino, pH de 9.8; 150 microlitros/pozo). Las

105
446

placas se leen después de 30 minutos en un lector de microtitulación (Bio-Rad) utilizando filtros de 405 y de 490 nanómetros.

Cálculos: Los valores se reportan como valores O.D. originales o como el porcentaje de Inhibición calculado sobre la media de los valores duplicados. Los datos adicionales se reportan como Medias $\pm$ SEM. Se utilizó una curva estándar de huiL-6 para medir la concentración de huiL-6 en los sobrenadantes de cultivo, mediante la utilización de un ajuste cúbico de la curva.

Resultados

Titulaciones de suero del ratón 27340:

Tabla 2. Titulaciones de suero anti-huiL-17 (ratón 27340).

Dilución en suero
Valores O.D. (Medias $\pm$ SEM)

<i>Día</i>	<i>huiL-17</i>	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
	<i>lote*</i>								
35	<i>E.coli</i>	1.795	1.524	1.167	0.854	0.615	0.378		
		± 0.022	± 0.006	± 0.015	± 0.013	± 0.005	± 0.032		

146
147

5

	<i>HEK/EBNA</i>	2.180	1.875	1.577	1.313	1.031	0.728		
		± 0.041	± 0.005	± 0.047	± 0.016	± 0.011	± 0.003		
99	<i>E.coli</i>		2.130	1.913	1.635	1.494	1.125	0.810	0.559
			± 0.078	± 0.0075	± 0.041	± 0.066	± 0.001	± 0.070	± 0.021
	<i>HEK/EBNA</i>		2.029	1.925	1.716	1.524	1.259	0.970	0.706
			± 0.005	± 0.030	± 0.012	± 0.004	± 0.018	± 0.036	± 0.002

10 Las placas de microtitulación se recubrieron con hUL-17 (3 microgramos/mililitro) de *E. coli* (BM-E3141/98) o de células HEK/EBNA (En.E-3382/82).

15 El suero del ratón 27340 se analiza en un ELISA para determinar la presencia de los anticuerpos anti-hUL-17 en los días 35 y 99, en dos preparaciones diferentes de hUL-17 (Tabla 2). Los resultados muestran que las titulaciones del suero del ratón 27340 aumentan aproximadamente 4 veces entre el día 35 y el día 99, y que se reconocen ambas preparaciones de hUL-17.

20 **Enlace en ELISA de los sobrenadantes de hibridoma:** Se prueban 684 sobrenadantes en el ELISA para determinar la presencia de los anticuerpos anti-hUL-17, utilizando dos preparaciones de hUL-17 recombinante, la primera de *E. coli* (BM-E3141/98) y la última de HEK/EBNA (En.E-3382/82). 52 sobrenadantes califican positivos para la presencia de anticuerpos anti-hUL-17 (Tabla 3). Se observa un enlace
25 preferencial a una o a la otra preparación de hUL-17 en unos

142
+48

cuantos casos. Los 28 hibridomas que se clonan subsecuentemente están subrayados.

Tabla 3. Reactividad de los sobrenadantes de cultivo en el ELISA.

5

10

15

20

25

Hibridoma No.	hull-17, lote* E. coli Valores O.D.	HEK/EBNA Valores O.D.	Hibridoma (No.)	hull-17, lote E. coli Valores O.D.	HEK/EBNA Valores O.D.
<u>1</u>	<u>1.935/1.830</u>	<u>ND</u>	<u>386</u>	<u>1.780/1.812</u>	<u>2.002/1.905</u>
<u>3</u>	<u>1.928/1.928</u>	<u>2.026/1.956</u>	<u>435</u>	<u>2.194/2.139</u>	<u>2.221/2.169</u>
<u>5</u>	<u>1.386/1.471</u>	<u>2.099/2.042</u>	<u>439</u>	<u>1.180/1.236</u>	<u>1.442/1.470</u>
<u>59</u>	<u>1.917/2.078</u>	<u>2.342/2.384</u>	<u>444</u>	<u>1.034/1.066</u>	<u>1.166/1.138</u>
<u>66</u>	<u>1.629/1.619</u>	<u>ND</u>	<u>450</u>	<u>2.060/2.209</u>	<u>2.079/2.237</u>
<u>104</u>	<u>2.650/2.716</u>	<u>2.439/2.366</u>	<u>477</u>	<u>1.392/1.348</u>	<u>1.515/1.524</u>
<u>106</u>	<u>1.329/1.371</u>	<u>1.362/1.465</u>	<u>496</u>	<u>2.131/2.078</u>	<u>2.569/2.798</u>
<u>110</u>	<u>2.355/2.363</u>	<u>2.425/2.497</u>	<u>504</u>	<u>1.755/1.559</u>	<u>ND</u>
<u>112</u>	<u>0.789/0.857</u>	<u>1.154/1.208</u>	<u>543</u>	<u>2.332/2.455</u>	<u>2.370/2.381</u>
<u>116</u>	<u>1.656/1.652</u>	<u>ND</u>	<u>544</u>	<u>1.145/1.196</u>	<u>1.187/1.201</u>
<u>128</u>	<u>1.244/1.669</u>	<u>0.714/0.695</u>	<u>548</u>	<u>0.728/0.750</u>	<u>0.891/0.909</u>
<u>142</u>	<u>1.192/1.322</u>	<u>0.847/0.810</u>	<u>552</u>	<u>0.824/0.811</u>	<u>0.969/0.943</u>
<u>173</u>	<u>1.899/2.108</u>	<u>1.966/2.023</u>	<u>557</u>	<u>2.241/2.326</u>	<u>2.347/2.483</u>
<u>182</u>	<u>0.948/0.903</u>	<u>0.874/0.866</u>	<u>564</u>	<u>0.628/0.675</u>	<u>0.808/0.820</u>

148
149

5

10

190	2.249/2.084	2.150/2.139	566	1.092/1.068	1.239/1.152
196	1.406/1.305	1.797/1.752	577	1.018/0.928	1.226/1.206
216	1.120/1.146	1.114/1.128	597	0.781/0.821	1.117/1.121
234	1.890/1.990	ND	612	1.935/1.777	2.033/1.989
277	1.674/1.640	ND	622	2.121/2.230	2.592/2.277
285	0.678/0.789	0.735/0.784	627	1.000/1.077	1.203/1.209
298	2.475/2.677	2.340/2.358	649	1.335/1.389	1.311/1.337
305	1.721/1.789	0.602/0.634	658	1.218/1.297	1.415/1.437
319	1.111/1.073	1.223/1.202	674	1.112/1.087	1.134/1.127
328	1.738/1.762	1.869/1.835	686	1.447/1.549	1.730/1.646
343	2.478/2.702	2.302/2.448	705	1.899/1.803	1.870/1.872
373	1.200/1.194	1.212/1.233	720	2.249/2.420	2.383/2.385

15

*Las placas se recubren con hUL-17 recombinante (3 microgramos/mililitro) a partir de *E. coli* (BM-E3141/98) ó a partir de células HEK/EBNA (En.E-3382/82). Los sobrenadantes se prueban en la dilución final de 1/3.

20

25

Enlace en ELISA de sobrenadantes de cultivo de los clones de hibridoma: En la Tabla 4 se muestra la reactividad en ELISA de los sobrenadantes de los clones de 11 hibridomas, que retuvieron la mejor producción de anticuerpo monoclonal anti-hUL-17. Los clones, realizados en negrillas, se seleccionaron para producir aproximadamente 1 litro de sobrenadante en botellas rodantes para la purificación y el análisis de los

149
150

anticuerpos. Con la excepción de los clones derivados a partir del
hibridoma No. 5, que produjeron un anticuerpo hulG3k, todos los
demás clones produjeron el anticuerpo monoclonal hulGk, como
fue evaluado por los anticuerpos monoclonales específicos del
isotipo.

Tabla 4. Reactividad en ELISA de los sobrenadantes de cultivo
para huiL-17.

<i>Clon (No.)</i>	<i>Sobrena- dantes* Valores O.D.</i>	<i>Clon (No.)</i>	<i>Sobrena- dantes* Valores O.D.</i>	<i>Clon (No.)</i>	<i>Sobrena- dantes* Valores O.D.</i>
3-2	2.198/1.940	106-1	1.244/1.308	543-4	1.003/0.913
3-20	1.909/1.939	106-2	1.203/1.138	543-16	0.795/0.717
3-21	1.873/1.812	106-3	1.178/1.168	557-6	0.879/0.940
5-18	1.240/1.168	110-7	1.535/1.393	557-36	0.980/0.925
5-22	1.340/1.386	110-28	1.376/1.370	557-37	1.104/1.109
5.29	1.318/1.354	305-21	1.484/1.518	622-2	0.923/0.894
5.31	1.227/1.302	305-38	1.669/1.858	622-5	1.070/1.032
5-40	1.364/1.543	343-1	1.351/1.375	622-6	0.980/0.953
104-2	1.385/1.299	439-80	2.506/2.543	658-2	0.744/0.744
104-4	1.085/1.044	450-13	1.568/1.610	658-6	0.769/0.772
104-9	1.488/1.304	450-23	1.658/1.667	658-16	0.741/0.758
104-11	1.670/1.380	543-1	1.074/0.991		

130
151

Las placas de microtitulación se recubren con huIL-17 recombinante (3 microgramos/mililitro) a partir de células HEK/EBNA (En.E-3382/82).

Actividad neutralizante de los sobrenadantes de cultivo:

5 Se prueban los sobrenadantes de cultivo para determinar la inhibición de la producción de huIL-6 por parte de fibroblastos dérmicos humanos estimulados con huIL-17 recombinante. Como se muestra en la Tabla 5, la mayoría de los sobrenadantes de cultivo muestran una actividad inhibidora.

10 **Tabla 5. Inhibición de la producción de IL-6 Inducida por huIL-17 en fibroblastos dérmicos humanos mediante los sobrenadantes de cultivo.**

Inhibición de la producción de IL-6 (%)

15

20

25

Clon (No.)	Cantidad de huIL-17 utilizada como estímulo (ng/ml)			
	62.6	125	250	500
3-20	86.3	75.0	33.1	23.2
3-40	23.3	41.4	20.3	19.0
104-11	47.7	48.5	22.2	16.3
106.1	61.6	19.8	5.7	9.8
110-28	99.8	92.5	88.6	61.3
305-38	47.2	47.1	36.6	23.7
343-1	96.8	102.4	90.5	66.4
450-23	51.7	48.5	47.5	26.6
543.4	-6.0	-12.0	-6.5	-7.1
622-2	34.0	23.2	20.3	18.4
658-16	34.4	27.7	12.7	18.8

Actividad neutralizante de AIN45: La selección del clon 110-28 para la producción del candidato de desarrollo AIN457 (modalidad preferida de la invención) se basa en la medición de la actividad neutralizante y afinidad en BIACORE 2000 de los anticuerpos modificados (ver en seguida el Ejemplo 2).

Ejemplo 2: AIN457 se enlaza con una afinidad muy alta a la IL-17 humana recombinante (huIL-17); la K_D es 122 ± 22 pM (BIAcore) y neutraliza la producción de IL-6 humana inducida por huIL-17 en fibroblastos dérmicos humanos; la IC_{50} es 2.1 ± 0.1 nM en una concentración de 1.87 nM de huIL-17.

a) Métodos

Reactivos: Los reactivos generales de laboratorio se adquieren en Merck o en Sigma, y son del grado de más alta pureza disponible; las fuentes de los reactivos de especialidad se detallan en seguida.

Proteínas: Los anticuerpos monoclonales se generan mediante la inmunización de ratones transgénicos MEDAREX con la IL-17 humana recombinante, y luego siguiendo el procedimiento convencional para producir líneas celulares, a partir de las cuales se podría purificar el material secretado mediante cromatografía con Proteína A-Sepharose (esencialmente como se describe en el Ejemplo 1). El AIN457 se almacena como una solución filtrada estéril en citrato de Na 50 nM, pH de 7.0, NaCl 140 mM a 4°C. El AIN457 humano recombinante (lote KB03303A) se obtiene en una solución de suministro estéril ya sea de citrato de Na 20

mM/regulador de fosfato 40 mM, pH de 7, NaCl 150 mM, o bien ácido acético 20 mM, pH de 5.5 ajustado con base-Tris 1M. Las concentraciones están usualmente en el intervalo de 2 miligramos/mililitro, y se diluyen una concentración final de 5 microgramos/mililitro en regulador BIA (HEPES 20 mM, pH de 7.4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.05 por ciento por volumen/volumen) para los experimentos Biacore.

La IL-17 humana recombinante se produce en casa; lote En/E 3882/83; 0.29 miligramos/mililitro.

10 **Mediciones BIAcore**

La determinación de los parámetros de enlace cinético y de los niveles de reactividad cruzada, se hace mediante mediciones de resonancia de plasmones superficiales utilizando el biosensor óptico BIAcore 2000 (BIAcore AB, Upsalla, Suecia, ver Lit. HS 1,2 para los detalles). Esta tecnología permite hacer la determinación sin marcas de las constantes microscópicas del índice para el enlace (k_{activada}) y la disociación ($k_{\text{desactivada}}$) de un ligando con un receptor. Por consiguiente, es especialmente adecuada para caracterizar las interacciones de anticuerpos-antígenos. Esta tecnología complementa, y en muchos aspectos es superior, a las mediciones ELISA (Van Regenmortel, Dev. Biol. (Basilea), 2003;112:141-51). Los estudios de enlace de la IL-17 recombinante con el anticuerpo AIN457 de IL-17, se llevan a cabo de dos maneras. En el protocolo estándar, el AIN457 es capturado por un anticuerpo Fcy anti-humano (Jackson

13
134

Immunochemicals; Cat. No. 109-005-098) que previamente se inmoviliza sobre un chip sensor BIAcore CM-5 (grado de investigación). El enlace covalente del anticuerpo de captura Fcy se hace con el "estuche de acoplamiento de amina" proporcionado por BIAcore (BIAcore, Cat. No. BR-100-50). Típicamente, se unen 3000 RUs de anticuerpo de captura a la superficie de dextrano activada con una solución de 30 microgramos/mililitro de anticuerpo anti-Fcy en regulador de Ac 10 mM, pH de 4.5, a una velocidad de flujo de 5 microlitros/minuto, lo cual conduce a aproximadamente 250 RUs de inmovilización de AIN457. Como una orientación, 1000 RUs corresponden a una transferencia de masa de 1 nanogramo/milímetro cuadrado. De una manera alternativa, el anticuerpo AIN457 de IL-17 8Sección 3.2; Tabla 4), se acopla directamente con la superficie del chip sin anticuerpo de captura. Los resultados se comparan con el protocolo descrito en la Tabla 9 (ver más adelante).

b) Resultados

Cinética de enlace del complejo de IL-17/AIN457

La constante de disociación en equilibrio K_D permite hacer algún juicio acerca de la estabilidad de los complejos, una vez formados *in vivo*. Por consiguiente, hemos determinado las constantes cinéticas para el enlace de la IL humana al anticuerpo AIN457 inmovilizado, y hemos derivado la K_D para el proceso a partir de estos datos. La Tabla 3 muestra el resumen de los datos obtenidos cuando se ajustan las curvas de dos experimentos al

modelo de Langmuir utilizando el software BIAevaluation 3.0. Aunque por supuesto, el anticuerpo es bivalente, el enlace se puede tratar como un evento de 1:1, exhibiéndose los sitios de enlace individuales del anticuerpo en la superficie que llega a ser
5 ocupada por las moléculas monoméricas de IL-17. Este experimento muestra tanto una asociación extremadamente rápida como la cinética de disociación muy lenta del complejo de anticuerpo-quimiocina. Se obtiene el mejor ajuste de datos cuando los sensogramas se tratan individualmente (en lugar que
10 globalmente, como se sugiere en la BIAevaluation). Por consiguiente, después de combinar la serie de titulación, obtenemos valores promedio a partir de 12 sensogramas de $k_{\text{activada}} = (4.1 \pm 0.1) \times 10^5 \text{ 1/M s}$; $k_{\text{desactivada}} = (3.8 \pm 0.5) \times 10^{-4} \text{ 1/s}$; y para $K_D = 122 \pm 22 \text{ pM}$.

Tabla 3. Constantes cinéticas del enlace 1:1 de IL-17 humana recombinante al NVP-AIN457.

	Conc [nM]	k_{activada} [1/Ms]	k_{desactivada} [1/s]	KD [M]	Exp. IL-314
5	2	3.31E+05	3.36E-05	1.02E-10	Prueba 1
	4	1.28E+05	3.78E-05	2.95E-10	
	8	3.79E+05	1.86E-05	4.90E-11	
	12	3.60E+05	3.00E-05	8.33E-11	
	16	3.52E+05	5.70E-05	1.62E-10	
10	20	3.52E+05	4.15E-05	1.18E-10	
	2	1.23E+06	1.97E-05	1.60E-11	Prueba 2
	4	4.11E+05	1.20E-05	2.92E-11	
	8	3.78E+05	4.54E-05	1.20E-10	
	12	3.46E+05	5.13E-05	1.48E-10	
15	16	3.17E+05	5.95E-05	1.88E-10	
	20	3.34E+05	5.01E-05	1.50E-10	
	Medio	4.10E+05	3.80E-05	1.22E-10	n=12
	SEM	7.73E+04	4.51E-06	2.21E-11	

20 **K_D media a partir de entradas individuales (verticalmente), en lugar de aplicar la ecuación $K_D = k_{desactivada}/k_{activada}$.**

Para el AIN457 producido en las células recombinantes (KB03303A), se llevan a cabo mediciones de afinidad para las citoquinas IL-17 de hombre, tití, Rhesus, y mono cinomolgo,
25 **respectivamente. Los detalles experimentales de las mediciones**

156
+57

Biacore son iguales a los descritos anteriormente para el anticuerpo MAB110-28. Se llevan a cabo dos pruebas independientes, probando seis concentraciones de IL-17 en cada prueba. Las concentraciones para la IL-17 humana son de 2, 4, 8, 12, 16, 20 nM, y de 10, 20, 30, 40, 50, 60 nM para todas las demás especies. El análisis de datos completo produce n=12 mediciones individuales para cada especie de IL-17. Se reportan la K_D así como SEM.

Tabla 4. Resumen: constantes cinéticas para el enlace de 1:1 de IL-17 humana recombinante, de tití, de Rhesus, y de mono cinomolgo con el NVP-AIN457 (KB03303A).

Especie	KD [M] Media Prueba 1+2	SEM
Humano	0.227 nM	+/- 0.03 nM
Tití	1.2 nM	+/- 0.1 nM
Mono Rhesus	9 nM	+/- 1 nM
Mono cinomolgo	6 nM	+/- 0.7 nM

En las siguientes Tablas 5 a 8 se dan los datos de todo el conjunto de los análisis BiAcCore para el anticuerpo KB03303A con $k_{activada}$, $k_{desactivada}$, y K_D , y las especies de IL-17 respectivas.

157
458

Tabla 5. Constantes cinéticas para el enlace de 1:1 de IL-17 humana recombinante con AIN457 (KB03303A).

5		Conc [nM]	k_{activada} [1/Ms]	k_{desactivada} [1/s]	KD [M]	Exp. IL-366/IL-365
		2	3.37E+05	6.43E-05	1.91E-10	Prueba 1
		4	2.59E+05	7.76E-05	2.99E-10	
		8	2.12E+05	5.21E-05	2.48E-10	
		12	2.18E+05	7.38E-05	3.38E-10	
10		16	2.02E+05	7.15E-05	3.54E-10	
		20	1.92E+05	8.04E-05	4.20E-10	
		2	5.50E+05	7.01E-05	1.27E-10	Prueba 2
		4	3.22E+05	3.30E-05	1.02E-10	
		8	2.85E+05	4.73E-05	1.66E-10	
15		12	2.86E+05	4.84E-05	1.69E-10	
		16	2.61E+05	3.09E-05	1.18E-10	
		20	2.58E+05	4.90E-05	1.90E-10	
		Media	2.82E+05	5.82E-05	2.27E-10	n=12
20		SEM	2.77E+05	4.81E-06	3.00E-11	

158
159

Tabla 6. Constantes cinéticas para el enlace de 1:1 de IL-17 de tit recombinante con AIN457 (KB03303A).

	Conc [nM]	k_{activada} [1/Ms]	k_{desactivada} [1/s]	KD [M]	Exp. IL-366/IL-365
5	10 nM	8.89E+04	7.96E-05	8.95E-10	Prueba 1
	20 nM	1.11E+05	8.69E-05	7.82E-10	
	30 nM	9.82E+04	1.15E-04	1.17E-09	
	40 nM	9.92E+04	1.16E-04	1.17E-09	
	50 nM	9.81e+04	1.19E-04	1.21E-09	
10	10 nM	8.83E+04	9.98E-05	1.13E-09	Prueba 2
	20 nM	1.10E+05	1.28E-04	1.17E-09	
	30 nM	9.70E+04	1.52E-04	1.57E-09	
	40 nM	9.66E+04	1.31E-04	1.36E-09	
	50 nM	9.52E+04	1.59E-04	1.67E-09	
15	Media	9.83E+04	1.19E-04	1.21E-09	N=10
	SEM	2.36E+03	8.09E-06	+0.1	

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

20	Conc [nM]	k_{activada} [1/Ms]	k_{desactivada} [1/s]	KD [M]	Exp. IL-366/IL-365
	10	1.70E+05	3.89E-04	2.28E-09	Prueba 1
	20	6.73E+04	4.94E-04	7.34E-09	
	30	5.86E+04	3.54E-04	6.04E-09	
25	40	3.27E+04	4.05E-04	1.24E-08	

159
160

5

10

50	4.05E+04	4.55E-04	1.12E-08	
60	3.50E+04	4.60E-04	1.31E-08	
10	5.47E+04	3.85E-04	7.04E-09	Prueba 2
20	4.62E+04	2.74E-04	5.93E-09	
30	4.30E+04	3.51E-04	8.16E-09	
40	3.76E+04	3.66E-04	9.74E-09	
50	3.60E+04	4.32E-04	1.20E-08	
60	3.44E+04	4.24E-04	1.23E-08	
Media	5.47E+04	3.99E-04	8.96E-09	n=12
SEM	1.09E+04	1.72E-05	9.70E-10	

Tabla 8. Constantes cinéticas para el enlace de 1:1 de IL-17 de mono cinomolgo recombinante con AIN457 (KB03303A).

15

20

25

Conc [nM]	k _{activada} [1/Ms]	k _{desactivada} [1/s]	KD [M]	Exp. IL- 366/IL-365
5 nM	3.27E+05	3.60E-04	1.10E-09	Prueba 1
10 nM	1.79E+05	4.02E-04	2.24E-09	
15 nM	1.03E+05	5.67E-04	5.50E-09	
20 nM	1.10E+05	5.23E-04	4.75E-09	
25 nM	9.23E+04	5.78E-04	6.26E-09	
30 nM	9.05E+04	7.14E-04	7.89E-09	
5 nM	7.18E+04	5.08E-04	7.08E-09	Prueba 2
10 nM	9.70E+04	6.69E-04	6.90E-09	

160
161

5

15 nM	1.03E+05	7.66E-04	7.41E-09	
20 nM	1.02E+05	7.32E-04	7.17E-09	
25 nM	1.02E+05	7.47E-04	7.34E-09	
30 nM	1.00E+05	8.34E-04	8.32E-09	
Media	1.23E+05	6.17E-04	6.00E-09	n=10
SEM	1.99E+04	4.34E-05	6.52E-10	

10

Subsecuentemente, se evalúa la actividad inhibidora del AIN457 purificado (lote En/E-10333/53; 0.54 miligramos/mililitro) sobre huIL-17. Los valores IC₅₀ se muestran en la Tabla 6. En estos experimentos, se incluyen huIL-17R/Fc y un anticuerpo monoclonal de ratón huIL-17 como controles positivos, y Simulet como control negativo.

15

Tabla 9. Neutralización de huIL-17 mediante el anticuerpo monoclonal humano AIN457 anti-hu-IL-17 en comparación con IL-17R/Fc, y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-huIL-17 (R&D Systems).

20

		AIN457 IC ₅₀ ± SEM (n=3*)	IL-17 R/Fc IC ₅₀ ± SEM (n=3)	MAB 317 IC ₅₀ ± SEM (n=3)
Recombinante	huIL-17	2.071±0.116 nM	1.713±0.305 nM	12.226±2.050 nM

25

@1.87 nM (30 nanogramos/mililitro).

*Las medias y SEM se calculan a partir de tres experimentos diferentes e independientes.

En conclusión, AIN457 aboga la secreción dependiente de IL-17 de la huIL-6 por parte de los fibroblastos dérmicos humanos. La potencia es comparable con aquélla de huIL-17R/Fc, y superior a aquélla de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-huIL-17 comercialmente disponible. Es interesante notar que se observa una inhibición más completa con AIN457 que con IL-17R/Fc.

10 **Ejemplo 3:** Pureza y secuencias parciales de aminoácidos de la secuenciación de aminoácidos de cadena pesada y ligera.

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

Clonación molecular de las regiones V_L y V_H : Se prepara ARN total a partir de 2×10^7 células de hibridoma (clon 110-7, clon 110-28) con el RNeasy Midi Kit, de acuerdo con el protocolo del

vendedor (Quiagen Hilden, Alemania). Se eluye el ARN total en 200 microlitros de agua exenta de ARNasa, y se almacena a -80°C. La síntesis del ADNc de la primera cadena se lleva a cabo con transcriptasa inversa M-MLV (Promega, Madison, WI), cebador de oligo-dT, mezcla de nucleótidos de reacción en cadena de la polimerasa (dNTPs), e inhibidor de ARNsin (Roche, Mannheim). Se mezclan 5 microgramos de ARN total con 1 microlitro de cebador de oligo-dT (0.5 microgramos/microlitro), y se agrega agua exenta de ARNsa hasta un volumen final de 36 microlitros. La mezcla se incuba a 70°C durante 10 minutos, y luego se almacena sobre hielo. Mientras está sobre hielo, se agregan los siguientes reactivos: 10 microlitros de regulador RT 5x, 2 microlitros de dNTPs (10 mM de cada uno), 2 microlitros de ARNsin, y 1 microlitro de transcriptasa Inversa M-MLV. La reacción se lleva a cabo a 42°C durante 1 hora. La reacción en cadena de la polimerasa se ensambla utilizando 4 microlitros de plantilla de ADNc, 2 microlitros de cada cebador a 10 µM cada uno (ver más adelante, y las Tablas 10 y 11 para un panorama), 20 microlitros de 2xQiamix (conteniendo Regulador, dNTPs, PolimerasaTAQ), y 1 microlitro de Polimerasa de ADN Pwo en un volumen total de 40 microlitros. Las condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa se establecen para 35 ciclos a 94°C durante 15 segundos, a 55°C durante 20 segundos, y a 72°C durante 30 segundos. El producto de la reacción en cadena de la polimerasa se subclona en el vector de clonación pCR4-TOPO-

Zero 8Stratagene, La Jolla, Ca.). Se recogen varios clones de cada reacción, y la secuencia de nucleótidos es determinada por Solvias AG (Basilea), utilizando los cebadores MV432 (SEQ ID NO:21), MV433 (SEQ ID NO:22), MV434 (SEQ ID NO:23), MV435 (SEQ ID NO:14), y los cebadores estándares en el ADN del vector.

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

El ADNc que codifica la cadena ligera se amplifica utilizando los pares de cebadores MV418 (SEQ ID NO:18)/#223 (SEQ ID NO:19) y MV419 (SEQ ID NO:20)/#223 (SEQ ID NO:19). Los cebadores cubren las secuencias de nucleótidos correspondientes a las siguientes posiciones de aminoácidos de la cadena ligera: MV417 posición -20/-14 (péptido de señal); MV419 posición +1/+7; #223 posición +210/+215. Este planteamiento permitió hacer dos amplificaciones de reacción en cadena de la polimerasa independientes para cada cadena de inmunoglobulina, dando como resultado dos secuencias de ADN independientemente establecidas.

Resultados y Discusión

Los productos de reacción en cadena de la polimerasa clonados que codifican para la cadena pesada y ligera de dos hibridomas (110-7 y 110-28, ver la Tabla 4 anterior) se caracterizan mediante secuenciación del ADN. Se utilizan 5 y 6 secuencias independientes para ensamblar las secuencias de cadena ligera y pesada. Los ADNcs de cadena ligera son todos idénticos, y cubren toda la secuencia de codificación (posición de aminoácidos -20 a +215). Los ADNcs de cadena pesada tuvieron dos malos emparejamientos diferentes en un ADNc cada uno. Éstos se excluyen de la secuencia final, la cual se extiende desde el codón de inicio hasta el final de la reticulación después del dominio constante 1 (posición de aminoácidos -19 a +238). Las secuencias para ambos hibridomas son idénticas. El ADNc obtenido del hibridoma 110-28 se selecciona y se utiliza para todo el trabajo de expresión adicional. Las SEQ ID NO:7 (ADNc de la cadena pesada de AIN457), SEQ ID NO:8 (secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de AIN457), SEQ ID NO:9 (ADNc de la cadena pesada de AIN457), y SEQ ID NO:10 (secuencia de aminoácidos de AIN457), muestran la secuencia de ADN que codifica para la cadena ligera y pesada de AIN457, junto con la secuencia de la proteína y la posición de los cebadores utilizados para la amplificación con reacción en cadena de la polimerasa y la secuenciación del ADN. Las secuencias de ADN se han registrado en PlasNova, número de acceso NPL003689

La secuencia de aminoácidos encontrada mediante la clonación del ADNc es idéntica a la previamente obtenida mediante degradación de Edman de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina purificadas, indicando que se ha clonado el ADNc correcto.

10

15

20

25

ACCCCTCTCTCCAGGGCCAGTCCAGATGTTACGACGACGCTACTTAGCCCTGGTACCGGCG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
TGGGAGAGGAGCTCCCGGTTGATCTCCAGATCTGTCCTGATGATCGGACCATGGTCTTC

5

EXPUGNANT LIBERATOR -

F D R F S G S G T D F T L T I S R L

B P B D F A V T Y C Q G Y G G S P C T F

15

P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N

F T P R E A K V Q W K V D N A L Q S O N

25

S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T -

CTGACCTGAGCAAAACGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCAT
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
GACTGCGACTCGTTTCGTCTGATGCTCTTTGTGTTTCAGATGCGGACGCTTCAGTGGTA

L T L S K A D Y E K E K V Y A C E V T H -

CAGGCGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCACAGGGGAGATGTGTAG
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 711
#223 GTCCCGACTCGAGCGGGCAGTTGTTTCTCGAAGTTGTCCCGCTCTCACATC

Q G L S S P V T K S F E R G E C -

10 **Tabla 11: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la cadena pesada.**

La secuencia de aminoácidos que codifica para el dominio variable está en negrillas y subrayada. Se indican los cebadores de oligonucleótidos utilizados para la clonación y la
15 secuenciación.

NV416 ACCATGGAATTGGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTTGTGTCTATTTAGAAAGTGTCCACTGT
1 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
TGGTACCTTAAACCCGACTCGACCCAAAGGAACAAAGTAAATCTTCACAGGTGCA

T N E L G L S W V F L V A I L E G V E C -

20 NV418 GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTC
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
CTCCAGGTCAACCACTCAGACCCCTCCGACCAAGGTCCGACCCCGAGGACTCTGAG

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L -

TCCTGTGAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAAGTATGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCT
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
AGGACAGTCCGAGACCTAAGTGGAAATCATTTGATAACCTACTTGACCCAGGCGGTCCGA

25

S C A A S G F T F S N Y W N N W V R Q A -

CCAGGGAAGAGGCTGGAGTGGGTGGCCGCCATAAACCAAGATGGAGTGAGAAATACTAT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
GGTCCCTTTCCCGACCTGACCCACCGCGGTATTGTGTTCTACCTTCACCTCTTATGATA

P G E G L E W V A A I N Q D G S E K Y Y -

GTGGGCTCTGTGAAGGCGGATTCACCATCTCCAGAGACACGCCAGAGAACTCACTGTAT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CACCCAGACACTTCCCGGCTAAGTGGTAAAGGTCTCTGTGTCCGGTCTCTGAGTGCATA

V G S V E G R F T I S E R D N A E N S L Y -

MV432 CTGCAATGAACAGCGCTGAGAGTCGAGGACACCGCTGTGTATTACTGTGTGAGGACTAT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
GACGTTTACTTGTGCGACTCTCAGCTCCTGTGCCGACACATAATGACACACTCCCTGATA

L Q N N S L R V E D F A V Y Y C V R D Y -

TACGATATTTGACGATATTACATCCACTATTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
ATGCTATAAACTGGCTAAZAAATGTAGGTGATAACCATGAAGCTAGAGACCCCGGACCG

Y D I L T D Y Y I N Y W Y F D L W G R G -

MV433 ACCCTGGTCACTGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGCGCCATCGGTCTTCCCGCTGGCACCC
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
MV434 TGGGACCACTGACAGAGGAGTCGAGGTTGGTTCCCGGGTAGCCAGAGGGGGACCGTGG

T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P -

TCCTCCAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTC
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
AGGAGGTTCTCGTGAAGACCCCGTGTCCCGGACCCGACCGACCACTTCCTGATGAG

S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F -

CCCGAACCGGTGACGGTGTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAAGCGCGGTGCACACCTTC
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
GGGCTTGGCCACTGCCACAGCACCTTGAATCCCGCGGACTGTGTCCCGCACGTGTGGAG

69
170

P E P V T V S W E S G A L T S G V H T F -

601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
6000ACAGGATGTCAGGAGTCTGAGATGAGGAGTCTGACCACTGACAGGAGG

5 P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S -

AGCAGCTTGGGCAAGGACCTACATCTGACAGTGAATCAGAGCCGAGCAACCAAG
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
NV435 TCTGCAACCCGTGGGTCTGGATGTAGAGCTTGCACCTTAGTGTTCGGGTCTTGTGGTTC

S S L G T Q T Y I C N V N E K P S N T K -

GTGACAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAACTCAGACATGCCACAGTGGCCA
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
8265 CACCTGTCTCTCAACTCGGGTTAGAACTGTTTTGAGTGTGTACGGGTGGCAGGGT

V D K R V E P E S C D K T E T C P P C P -

TAA
781 --- 783
ATT

15

Ejemplo 4: Estructura tridimensional del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal AIN457 anti-IL-17A humana.

Con el objeto de determinar la conformación de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs), y la estructura del sitio de enlace de antígeno del AIN457, se genera el fragmento Fab, se cristaliza, y se determina su estructura de rayos-X mediante cristalografía de proteínas.

Método: El fragmento Fab de NVP-AIN457 se produce mediante disociación de papaina a partir del anticuerpo entero, y se purifica mediante cromatografía de proteína A, seguida por

cromatografía de exclusión de tamaños. Luego se concentra el material purificado mediante ultrafiltración hasta 20 miligramos/mililitro en Tris-HCl 10 mM, pH de 7.4, NaCl 25 mM, TCEP 5 mM. Los cristales se hacen crecer mediante la técnica de difusión de vapor en gotas escurridas a 19°C, a partir de sulfato de amonio 2.0M, PEG 400 al 5 por ciento, Na MES 0.1M, pH de 6.5. En el espacio son el grupo P2₁2₁2₁ con dimensiones celulares unitarias de a=90.3Å, b=106.7Å, c=131.4Å, y dos moléculas Fab por unidad asimétrica. Antes de la recopilación de datos de rayos-X, se reticula un solo cristal del Fab de AIN457 con glutaraldehído, empleando el método de Lusty (J. Appl. Cryst. (1999) 32, 106-112), y luego se transfiere a una solución que contiene Li₂SO₄ 2.0M, PEG 400 al 2 por ciento, y Na MES 0.1M, pH de 6.5. Subsecuentemente se monta el cristal en un crio-ciclo y se congela instantáneamente para la recolección de los datos a 95°K. Se registran 180 imágenes de difracción correspondientes a una oscilación de 1.0 grado. Los datos de difracción se procesan con el programa HKL. La estructura se determina hasta una resolución de 2.5Å mediante reemplazo molecular. Luego se refina la estructura mediante dinámica de ángulo de torsión y minimización de energía utilizando el programa CNX.

Resultados: Están presentes dos moléculas de Fab de AIN457 en la unidad asimétrica del cristal, con el ciclo H-CDR3 de ambas moléculas Fab involucradas en los contactos de proteína-proteína para el ciclo H-CDR3 de los Fabs relacionados

171
172

con la simetría. Las dos moléculas Fab muestran diferentes ángulos de hombro, pero tienen de otra manera conformaciones de ciclo de CDR esencialmente idénticas (ver la Tabla 12 para la secuencia de aminoácidos de los ciclos de la CDR). El ciclo H-CDR1 adopta la estructura canónica esperada de H1:1, mientras que la conformación del ciclo H-CDR se empareja con aquél de la estructura canónica H2:3A. El ciclo H-CDR3 del anticuerpo AIN457 es excepcionalmente largo, comprendiendo 18 residuos en las posiciones Kabat 94 (Arg H98) y 101 (Asp H115). Muestra la estructura de torso abultado típica estabilizada por un puente de sal entre la cadena lateral de Arg en la posición 94 (Arg H98) y el grupo carboxilato de Asp en la posición H101 (Asp H115), y por una interacción enlazada con H entre la cadena lateral de Trp H117 y el grupo carbonilo de la cadena principal de Phe H114. La cabeza del ciclo H-CDR tiene la estructura de una horquilla-beta torcida larga, con un segundo abultamiento-beta en su base y una vuelta-beta tipo I' en su ápice. Una característica sorprendente el ciclo H-CDR3 de AIN457 es su contenido muy alto de residuos aromáticos: 6 tirosinas, 2 triptófanos, 1 fenilalanina. Debido a que todos los demás ciclos de CDR contribuyen con una o más tirosinas cada uno, el sitio de combinación de antígeno del AIN457 posee 11 tirosinas en total. Las conformaciones de los ciclos L-CDR1 y L-CDR2 corresponden a las estructuras canónicas L1:6 y L2:1, respectivamente. En contraste con H-CDR3, el ciclo L-CDR3 es corto (6 residuos), y la muestra la

172
173

estructura canónica comúnmente observada L3:1, con una cis-
prolina en su punta (Pro L96), una glutamina en la posición de
Kabat 90 (Gln L91), y una treonina en la posición de Kabat 97
(Thr L98). Sin embargo, una característica muy inusual del ciclo
5 L-CDR3 de AIN457 es la presencia de un residuo de cisteína
después de la cis-prolina (Cys L97). La cadena lateral de Cys L97
está en el fondo de una depresión superficial localizada en la
interfase de V_L-V_H, y revestida por los residuos Trp H112, Trp
H47, y Tyr L92.

10 **Tabla 12:**

Cadena Ligera		
° L-CDR1	Definición de Kabat	R-A-S-Q-S-V-S-S-S-Y-L-A
	Definición de Chothia/rayos-X	R-A-S-Q-S-V-S-S-S-Y-L-A
° L-CDR2	Definición de Kabat	G-A-S-S-R-A-T
	Definición de Chothia/rayos-X	G-A-S-S-R-A-T
° L-CDR3	Definición de Kabat	Q-Q-Y-G-S-S-P-C-T
	Definición de Chothia/rayos-X	Q-Q-Y-G-S-S-P-C-T
Cadena Pesada		
° H-CDR1	Definición Kabat	N-Y-W-M-N
	Definición de Chothia/rayos-X	G-F-T-F-S-N-Y-W-M-N

25

173
174

5

° H-CDR2	Definición de Kabat	A-I-N-Q-D-G-S-E-K-Y-Y-V- G-S-V-K-G
	Definición de Chothia/rayos-X	A-I-N-Q-D-G-S-E-K-Y-Y
° H-CDR3	Definición de Kabat	D-Y-Y-D-I-L-T-D-Y-Y-I-H- Y-W-Y-F-D-L
	Definición de Chothia/rayos-X	C-V-R-D-Y-Y-D-I-L-T-D-Y- Y-I-H-Y-W-Y-F-D-L-W-G

10

15

Tabla 12: Secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables de los anticuerpos monoclonales AIN457, basándose en la definición de Kabat y como se determina mediante el análisis de rayos-X, utilizando el planteamiento de Chothia y colaboradores. Los aminoácidos realzados en negrillas son parte de los ciclos de la CDR, mientras que los mostrados en estilo normal, son parte de la estructura del anticuerpo.

174
175

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de enlace de IL-17 que es capaz de inhibir la actividad de la IL-17 humana 1 nM en una concentración menor a 5 nM por el 50 por ciento, y esta actividad inhibidora se mide sobre la producción de IL-6 inducida por hIL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

2. Una molécula de enlace de IL-17, la cual comprende ambos dominios variables de cadena pesada (V_H) y de cadena ligera (V_L); la molécula de enlace de IL-17 comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3, teniendo la CDR1 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, teniendo la CDR2 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, y teniendo la CDR3 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3, o sus equivalentes de CDR directos; y

b) un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', teniendo la CDR1' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, teniendo la CDR2' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, y teniendo la CDR3' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6, o sus equivalentes de CDR' directos.

175
~~176~~

3. Una molécula de enlace de IL-17 que comprende ambos dominios variables de cadena pesada (V_H) y de cadena ligera (V_L); la molécula de enlace de IL-17 comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno que comprende:

5 a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1-x, CDR2-x, y CDR3-x, teniendo la CDR1-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11, teniendo la CDR2-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID
10 NO:12, y teniendo la CDR3-x la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:13, o sus equivalentes de CDR-x directos; y

 b) un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', teniendo la
15 CDR1' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, teniendo la CDR2' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, y teniendo la CDR3' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6, o sus equivalentes de CDR' directos.

20 4. La molécula de enlace de IL-17 de acuerdo con la reivindicación 1, 2, ó 3, la cual es un anticuerpo humano.

 5. Una molécula de enlace de IL-17, la cual comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno que comprende ya sea un primer dominio que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a la mostrada a la SEQ ID NO:8,
25 empezando con el aminoácido en la posición 1, y finalizando con

el aminoácido en la posición 127, ó bien un primer dominio como se describe anteriormente, y un segundo dominio que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a la mostrada en la SEQ ID NO:10, empezando con el aminoácido en la posición 1, y finalizando con el aminoácido en la posición 109.

6. Una construcción de ADN que ~~codifica~~ codifica una molécula de enlace de IL-17 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Una construcción de ADN, la cual comprende una molécula de ADN que es sustancialmente homóloga ya sea a la SEQ ID NO:7 ó un equivalente de ADN_H directo de la misma; o a la SEQ ID NO:9 ó un equivalente de ADN_L directo de la misma.

8. Una construcción de ADN, la cual comprende dos moléculas de ADN, de las cuales una es sustancialmente homóloga a la SEQ ID NO:7 ó un equivalente de ADN_H directo de la misma, y la otra es sustancialmente homóloga a la SEQ ID NO:9 ó un equivalente de ADN_L directo de la misma.

9. Un vector de expresión capaz de replicarse en una línea celular procariótica o eucariótica, el cual comprende cuando menos una construcción de ADN de acuerdo con las reivindicaciones 6, 7, u 8.

10. Un proceso para la producción de una molécula de enlace de IL-17, el cual comprende: (i) cultivar un organismo que se transforma con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 9, y (ii) recuperar la molécula de enlace de IL-17

del cultivo.

11. El uso de una molécula de enlace de IL-17 de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, para la fabricación de un medicamento.

5 12. El uso de una molécula de enlace de IL-17 de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por IL-17.

10 13. El uso de una molécula de enlace de IL-17 de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, para el tratamiento de osteoartritis, artritis reumatoide, osteoporosis, y otros artrítidos inflamatorios.

15 14. Un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por IL-17 en un paciente que lo necesite, el cual comprende administrar al paciente una cantidad efectiva de una molécula de enlace de IL-17 de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5.

20 15. Una composición farmacéutica, la cual comprende un anticuerpo para IL-17 de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, en combinación con un excipiente, diluyente, o vehículo farmacéuticamente aceptable.

178
179

RESUMEN

Se proporciona una molécula de enlace de IL-17, en particular un anticuerpo para IL-17 humana, más preferiblemente un anticuerpo humano para IL-17 humana, en donde las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera tienen secuencias de aminoácidos como se definen, para utilizarse en el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por IL-17, por ejemplo artritis reumatoide.

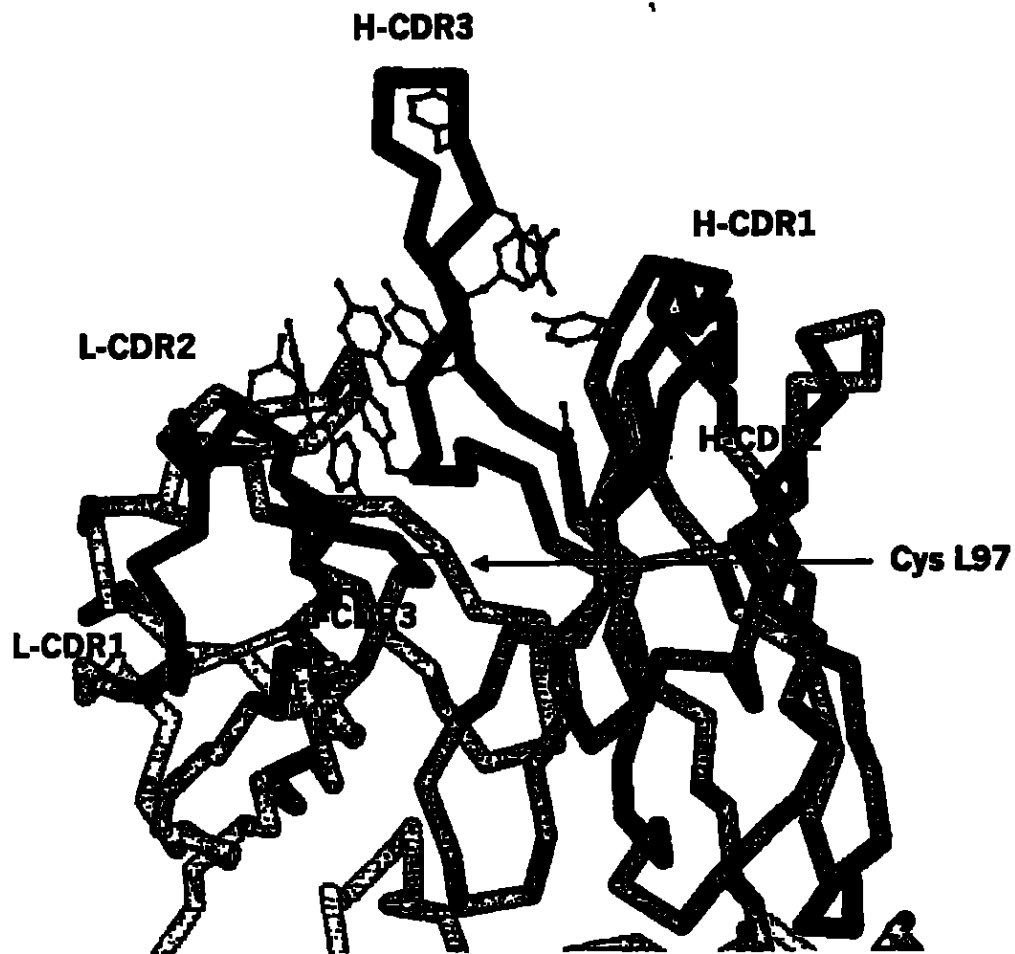
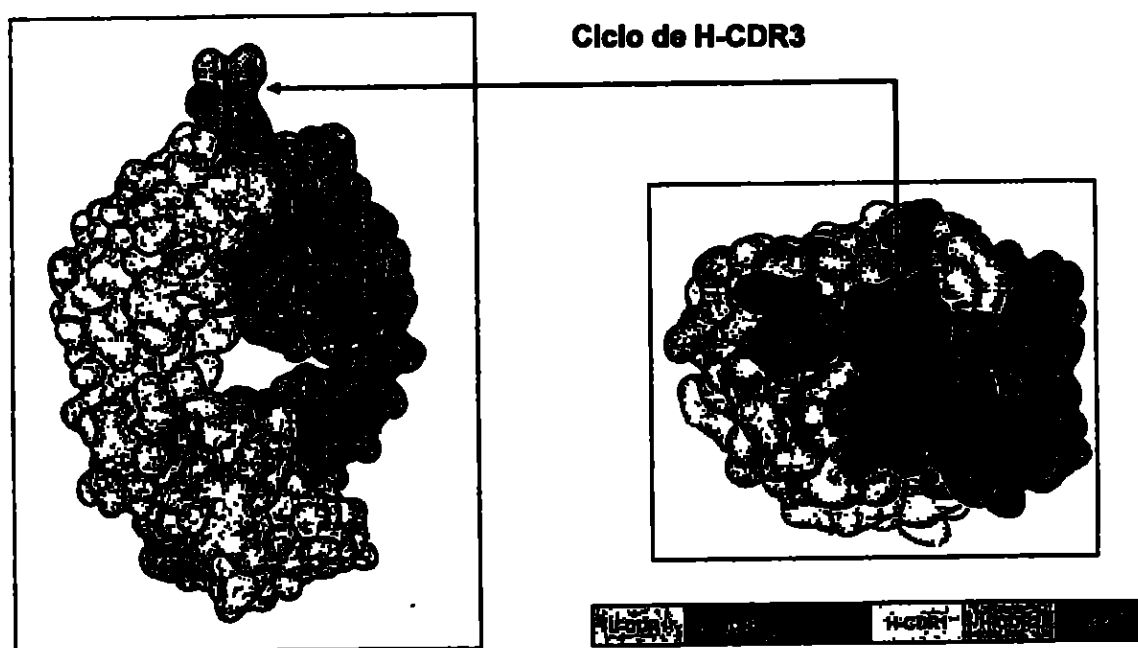


Figura 1. Estructura de rayos-X de Fab de AIN457.

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



**Figura 2. Estructura de rayos-X de Fab de AIN457,
vista global.**

Representación de la superficie de Van der Waals del Fab de AIN457. Las cadenas ligera y pesada están coloreadas en gris claro y oscuro, respectivamente. Los ciclos de CDR están resaltados en diferentes colores. Observe la presencia del ciclo de H-CDR3 que sobresale hacia fuera del sitio de combinación de antígeno del anticuerpo.

181
+82

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG
<120> Compuesto Orgánico
<130> 4-33392P1
5 <160> 23
<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
<211> 5
10 <212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR1 region of AIN457
15

<220>
<221> DOMINIO
<222> (1)..(5)
<223> CDR1 = región hipervariable 1 de cadena pesada de
AIN457

<400> 1

Asn Tyr Trp Met Asn
25 1 5

182
183

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> CDR2 de AIN457

<220>

10

<221> DOMINIO
<222> (1)..(17)
<223> CDR2 = región hipervariable 2 de cadena pesada de
AIN457

15

<400> 2

Ala Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Gly Ser Val Lys
1 5 10 15



Gly

<210> 3
<211> 18
<212> PRT
<213> artificial

25

183
484

<220>

<223> CDR3 de AIN457

<220>

5 <221> DOMINIO

<222> (1)..(18)

<223> CDR3 = región hipervariable 3 de cadena pesada de
AIN457

10 <400> 3

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

15 Asp Leu

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> CDR1' de AIN457

25 <220>

<221> DOMINIO
<222> (1)..(12)
<223> CDR1' = región hipervariable 1 de cadena ligera de
AIN457

5

<400> 4

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

10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> artificial

15

<220>
<223> CDR2' de AIN457

<220>
<221> DOMINIO
<222> (1)..(7)
<223> CDR2' = región hipervariable 2 de cadena ligera de
AIN457

25

<400> 5

185
+86

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 6

5 <211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220>

10 <223> CDR3' de AIN457

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(9)

15 <223> CDR3' = región hipervariable 3 de cadena ligera de
AIN457

<400> 6



Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Cys Thr

1 5

<210> 7

<211> 381

25 <212> ADN

186
187

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(381)

<223> ADN de dominio de cadena pesada de AIN457

<400> 7

gag gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gtc cag cct ggg ggg
10 48

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

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agt aac tat
15 96

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

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

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

gcc gcc ata aac caa gat gga agt gag aaa tac tat gtg ggc tct gtg
25 192

187
188

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

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

5 240

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

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

10 288

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

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

15 336

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

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

381

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

<210> 8

25 <211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

10

20

25

30

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

35

40

45

15

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

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

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

85

90

95

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

25

100

105

110

189
+90

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

<210> 9

5 <211> 327

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> CDS

<222> (1)..(327)

<223> ADN de parte variable de cadena ligera de AIN457

<400> 9

15 gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg
48

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

 gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc
96

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

25 144

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

35

40

45

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

5 192

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

50

55

60

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

10 240

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

65

70

75

80

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

15 288

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

85

90

95

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

327

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

100

105

<210> 10

25 <211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

5

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

1 5 10 15

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

10 20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

20

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

85 90 95

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

25 100 105

192
193

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> CDR1-x de AIN457

<220>

10

<221> DOMINIO
<222> (1)..(10)
<223> CDR1-x = dominio hipervariable x de cadena pesada de
AIN457

15

<400> 11

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Met Asn
1 5 10

3

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial

25

<220>

<223> CDR2-x de AIN457

<220>

<221> DOMINIO

5 <222> (1)..(11)

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

<400> 12

10 Ala Ile Asn Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr
1 5 10

<210> 13

<211> 23

15 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> CDR3-x de AIN457



<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(23)

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

<400> 13

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

1

5

10

15

5

Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly

20

<210> 14

10

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial

<220>

15

<223> Cebador para clonación de cadena pesada de AIN457

<220>

<221> enlace_cebador

<222> (1)..(20)

20

<223> MV432

<400> 14

gactattacg atattttgac

20

25

<210> 15

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial

5

<220>

<223> Cebador para clonación de cadena pesada de AIN457

<220>

10 <221> enlace_cebador

<222> (1)..(20)

<223> MV433

<400> 15

15 gcctccacca agggcccatc

20

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Cebador para clonación de cadena pesada de AIN457

25

<220>

<221> enlace_cebador

<222> (1)..(20)

<223> MV434

5

<400> 16

tggttcccgg gtagccagaa

20

10

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial

15

<220>

<223> Cebador para clonación de cadena pesada de AIN457

<220>

<221> enlace_cebador

<222> (1)..(20)

<223> MV435

<400> 17

ccacctgttc tctcaactcg

25

20

197
~~198~~

<210> 18

<211> 24

<212> ADN

<213> artificial

5

<220>

<223> PCR de cadena pesada de AIN457

<220>

10 <221> enlace_cebador

<222> (1)..(24)

<223> MV416

<400> 18

15 accatgggaat tgggggctgag ctgg

24

<210> 19

<211> 26

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> PCR de cadena pesada de AIN457

25

198
149

<220>

<221> enlace_cebador

<222> (1)..(26)

<223> #265

5

<400> 19

gagtgtgtac ggggtggcacg ggtatt

26

10

<210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> artificial

15

<220>

<223> PCR de cadena pesada de AIN457

<220>

<221> enlace_cebador

20

<222> (1)..(21)

<223> MV418

<400> 20

gaggtgcagt tgggtggagtc t

25

21

199
200

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

5

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

<220>
<221> enlace_cebador
<222> (1)..(24)
<223> MV417

10

<400> 21

15

accatggaaa cccagcgga gctt
24

<210> 22
<211> 22
<212> ADN
<213> artificial

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

25

200
201

<220>
<221> enlace_cebador
<222> (1)..(22)
<223> #223

5

<400> 22
gaagttgtcc cctctcaciaa tc
22

10

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

15

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

<220>
<221> enlace_cebador
<222> (1)..(21)
<223> MV419

<400> 23
gaaattgtgt tgacgcagtc t

25

21

201
202

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 A61K39/395 A61P29/00
 //C07K16/24

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)
 IPC 7 C07K

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, EMBASE, BIOSIS, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/058717 A (IMMUNEX CORPORATION; MOHLER, KENDALL, M) 1 August 2002 (2002-08-01) examples 1,4	1,6, 11-15
A	R&D SYSTEMS: "Monoclonal Anti-human IL-17 Antibody" R&D SYSTEMS CATALOGUE, 'Online! 11 January 2004 (2004-01-11), XP002351567 Retrieved from the Internet: URL: http://cytokine.rndsystems.com/pdf/MAB317.pdf > 'retrieved on 2005-10-27! the whole document	1-10

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in 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

- "I" 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.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 November 2005

Date of mailing of the international search report

14/11/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 6818 Patentkan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wagner, R

22
203

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHABAUD M ET AL: "Contribution of Interleukin 17 to Synovium Matrix Destruction in Rheumatoid Arthritis" CYTOKINE, ACADEMIC PRESS LTD, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 12, no. 7, July 2000 (2000-07), pages 1092-1099, XP002218621 ISSN: 1043-4666 page 1093	11-15
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 200051 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2000-551579 XP002352043 & JP 2000 186046 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD) 4 July 2000 (2000-07-04) abstract	10-15
A	LUBBERTS ERIK: "The role of IL-17 and family members in the pathogenesis of arthritis." CURRENT OPINION IN INVESTIGATIONAL DRUGS (LONDON, ENGLAND : 2000) MAY 2003, vol. 4, no. 5, May 2003 (2003-05), pages 572-577, XP009056201 ISSN: 1472-4472 the whole document	10-15
A	WO 00/69463 A (SCHERING CORPORATION; INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE) 23 November 2000 (2000-11-23) the whole document	1-12
A	WO 97/04097 A (GENETICS INSTITUTE, INC) 6 February 1997 (1997-02-06) the whole document	1-12
A	DUMONT F J: "IL-17 cytokine/receptor families: Emerging targets for the modulation of inflammatory responses" EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS 01 MAR 2003 UNITED KINGDOM, vol. 13, no. 3, 1 March 2003 (2003-03-01), pages 287-303, XP002351568 ISSN: 1354-3776 the whole document	10-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/008470

203

COA

Box 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:
Although claims 14 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

The International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers 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.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02058717	A	01-08-2002	CA 2425506 A1	01-08-2002
			EP 1326626 A2	16-07-2003
			JP 2004517918 T	17-06-2004
			MX PA03003407 A	04-05-2004
JP 2000186046	A	04-07-2000	NONE	
WO 0069463	A	23-11-2000	AU 4033900 A	05-12-2000
			CA 2373938 A1	23-11-2000
			EP 1053751 A1	22-11-2000
			JP 2004500325 T	08-01-2004
			MX PA01011923 A	15-10-2003
WO 9704097	A	06-02-1997	AT 295414 T	15-05-2005
			AU 727480 B2	14-12-2000
			AU 6712396 A	18-02-1997
			CA 2227220 A1	06-02-1997
			DE 69634726 D1	16-06-2005
			DK 0839196 T3	12-09-2005
			EP 0839196 A2	06-05-1998
			JP 11510045 T	07-09-1999



**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◆ 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 []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de 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 []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

02 FEB. 2007

Fecha

Carrera 13, No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

296



OLARTE RAIS

27101
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-010438- -00000-0000
Fec: 2007-02-02 10:47:17 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE/VI
EVE 270 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION
Forma: 205

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD
PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

- 1 ☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
- ☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.

2
SOLICITANTE
(71)

Nombre: NOVARTIS AG
Dirección: Lichtstrasse 35, CH-456 Basel
Nacionalidad o Domicilio: Suiza
Lugar de Constitución: Suiza
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 797827478ta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PÁGINA ADJUNTA
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA
Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

3
PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2005/008470 Fecha Agosto 4, 2005
Publicación Internacional No. WO 2006/013107 Fecha Febrero 9, 2006

4
Título (54) ANTICUERPOS ANTAGONISTAS DE IL-17

Clasificación Internacional (51) A61K 39/395; A61P 29/09; C07K 16/24

Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI ☒ NO ☐	<u>GB</u>	<u>Agosto 4, 2004</u>	<u>0417487.6</u>

LISTA DE INVENTORES PCT/EP2005/008470

- 1. FRANCO E. DI PADOVA**
Kluenenfeldstrasse 45,
CH-4127 Birsfelden
Suiza.
Nacionalidad: Italiana
- 2. HERMANN GRAM**
Am Bischofsacker 20,
79576 Weil am Rhein
Alemania.
Nacionalidad: Alemana
- 3. HANS HOFSTETTER**
Chrishonsweg 92,
CH-4125 Riehen
Suiza.
Nacionalidad: Suiza
- 4. MARGIT JESCHKE**
Grenzacher Str. 10,
CH-4058 Basel
Suiza.
Nacionalidad: Alemana
- 5. JEAN-MICHEL RONDEAU**
2, Impasse du Pressoir,
F-68170 Rixheim
Francia.
Nacionalidad: Francesa
- 6. WIM VAN DEN BERG**
Ridderlaan 12,
NL-6584 CB Molenhoek.
Países Bajos.
Nacionalidad: Países Bajos

11/11/2005
PCT 2005

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de enlace de IL-17 que es capaz de inhibir la actividad de la IL-17 humana 1 nM en una concentración menor a 5 nM por el 50 por ciento, y esta actividad inhibidora se mide sobre la producción de IL-6 inducida por hIL-17 en fibroblastos dérmicos humanos.

2. Una molécula de enlace de IL-17, la cual comprende ambos dominios variables de cadena pesada (V_H) y de cadena ligera (V_L); la molécula de enlace de IL-17 comprende cuando menos un sitio de enlace de antígeno que comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1, CDR2, y CDR3, teniendo la CDR1 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, teniendo la CDR2 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, y teniendo la CDR3 la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3, o sus equivalentes de CDR directos; y

b) un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L), el cual comprende, en secuencia, las regiones hipervariables CDR1', CDR2', y CDR3', teniendo la CDR1' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4, teniendo la CDR2' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5, y teniendo la CDR3' la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6, o sus equivalentes de CDR' directos.

209

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
NOVARTIS AG

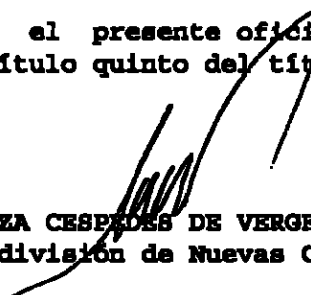
REFERENCIA	Radicación No.	7 10436
	Solicitud internacional	PCT/EP2005/008470
	Fecha inicio fase nacional	04/03/2007
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	2592

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. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. 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. (Art. 26-k) Decisión 486.

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 CARMONA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 4. 23-FEB. 2007
lerazo