

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1 Titulo de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

Anticuerpos anti-CCL17

2 Datos del Solicitante

Nombre:	JANSSEN BIOTECH, INC.	Dirección Electrónica:	notificaciones@clarkemodet.com.co
Dirección:	800/850 Ridgeview Drive	Domicilio/País de constitución:	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - PENNSYLVANIA - HORSHAM

Identificación:

☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT
☐ PASAPORTE

Número: 900044364-

3 Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social	Tipo	Identificación
1. JANSSEN BIOTECH, INC.	NN	900044364

4 Datos del Inventor

Nombre:	Ken BOAKYE	Dirección Electrónica:	notificaciones@clarkemodet.com.co
----------------	------------	-------------------------------	-----------------------------------

Dirección:		1400 McKean Road	Domicilio/País de constitución:	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - PENNSYLVANIA - SPRING HOUSE
Identificación:				
☐ CEDULA DE CIUDADANIA		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA		
☐ EMPRESA EXTRANJERA		☐ NIT		
☐ PASAPORTE		☒ No Aplica		
Número:		-		
5	Inventor(es)			
Apellidos - Nombres		Domicilio		
1.	BOAKYE Ken	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
2.	DEL VECCHIO Alfred	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
3.	KEHOE John	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
4.	LACY Eilyn	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
5.	MURRAY Lynne	REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA		
6.	RYAN Mary	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
7.	SANTULLI-MAROTTO Sandra	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
8.	WHEELER John	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
9.	WHITAKER Brian	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
10.	TEPLYAKOV Alexey	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		
6	Datos Inventor(es)			
País de Residencia		Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	PENNSYLVANIA	SPRING HOUSE	1400 McKean Road

2.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	PENNSYLVANIA	SPRING HOUSE	1400 McKean Road
3.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	PENNSYLVANIA	SPRING HOUSE	1400 McKean Road
4.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	PENNSYLVANIA	SPRING HOUSE	1400 McKean Road
5.	REINO UNIDO DE LA GRAN BRETAÑA	INGLATERRA	CAMBRIDGESHIRE	Cherry Cottage, 137 High Street, Melbourn
6.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	PENNSYLVANIA	SPRING HOUSE	1400 McKean Road
7.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	PENNSYLVANIA	SPRING HOUSE	1400 McKean Road
8.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	PENNSYLVANIA	SPRING HOUSE	1400 McKean Road
9.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	PENNSYLVANIA	SPRING HOUSE	1400 McKean Road
10.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	PENNSYLVANIA	SPRING HOUSE	1400 McKean Drive
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO	Dirección Electrónica:	notificaciones@clarkemodet.com.co
Dirección:		CARRERA 11 NO. 86-53	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - CUNDINAMARCA - BOGOTA D.C.
Identificación:				

☒ CEDULA DE CIUDADANIA
☐ EMPRESA EXTRANJERA
☐ PASAPORTE

☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ NIT

Número:

66783790-

Presentación de Poder

Año de Radicación

Número de Radicación

8

Datos Solicitud: PCT / WO

Número Solicitud:

PCT/US2014/064302

Fecha Solicitud:

06/11/2014

Número Publicacion:

WO 2015/069865

Fecha Publicacion:

14/05/2015

9

Declaraciones de prioridad

☒ SI ☐ NO

	(33) País de origen	Codigo del país	(31) No. Solicitud	(32) Fecha
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	US	61/900,596	06/11/2013

10

Reivindicaciones

Número reivindicaciones:

37

Pago Reivindicaciones:

Si

11

Reducción de tasas.

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

- ☐ Micro, pequeñas y medianas empresas
☐ Universidades públicas o privadas
☐ Entidades sin ánimo de lucro

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

12

Documentos Anexos

- ☒ Reivindicaciones
☒ Descripción
☐ Dibujos y/o Figuras
☒ Resumen
☐ Certificado Depósito Material Biológico
☐ Uso de Conocimiento tradicional

- ☒ Listado de secuencias
- ☐ Artes finales 12 x 12 cm
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☒ Otros Anexos

Anticuerpos anti-CCL17

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 61/900.596, presentada el 6 de noviembre de 5 2013, cuyo contenido se incorpora en la presente descripción como referencia.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a los anticuerpos que se unen específicamente a CCL17, los polinucleótidos que codifican los anticuerpos 10 o fragmentos, y los métodos de preparación y los usos de estos.

Antecedentes de la invención

La quimiocina homeostática, CCL17 (TARC, ligando 17 de quimiocinas (motivo C-C)) es un potente quimioatrayente de linfocitos. CCL17 15 es un ligando para CCR4, un GPCR que se considera que es importante para la función de células T y la quimiotaxis y la migración de células inmunes a sitios de inflamación. CCR4 se expresa predominantemente en linfocitos Th2, células asesinas naturales y células iNKT.

Se ha asociado a la CCL17 con enfermedades humanas que afectan a 20 diversos órganos, tales como colitis ulcerativa (UC, por sus siglas en inglés), dermatitis atópica (AD, por sus siglas en inglés), fibrosis pulmonar idiopática (IPF, por sus siglas en inglés) y asma (Belperio *et al.*, *J Immunol*, 173: 4692-469, 2004; Christophi *et al.*, *Inflamm Bowel Dis*. doi: 10.1002/ibd.2295; Inoue *et*

al., *Eur Respir J*, 24: 49-56, 2004; Kakinuma *et al.*, *J Allergy Clin Immunol*, 107: 535-541, 2001; Saeki and Tamaki, *J Dermatol Sci*, 43: 75-84, 2006; Tamaki *et al.*, *J Dermatol*, 33: 300-302, 2006). En ratones, la CCL17 se ha vinculado a diversas afecciones inflamatorias e infecciones tales como inflamación pulmonar crónica presente en modelos de fibrosis y asma, colitis y esquistomiasis, presumiblemente, al inducir respuestas de Th2 mediante el reclutamiento de células inmunes CCR4⁺. La neutralización de CCL17 mejora los impactos de la enfermedad en los modelos de asma tanto por *A. fumigatus* como por ovalbumina (OVA), y en el daño hepático en el modelo de ratón con P. acnes de lesión hepática inducida al bloquear el influjo de células T (Carpenter y Hogamoam *Infect Immun*, 73:7198 - 7207, 2005; Heiseke *et al.*, *Gastroenterology*, 142:335-345; Hogamoam *et al.*, *Med Mycol*, 43 Supl 1, S197-202, 2005; Ismailoglu *et al.*, Therapeutic targeting of CCL17 via the systemic administration of a monoclonal antibody ameliorates experimental fungal asthma. Trabajo presentado en *Am J Respir Crit Care Med*, 2011; Jakubzick *et al.*, *Am J Pathol*, 165:1211-122, 2004; Kawasaki *et al.*, *J Immunol*, 166:2055-2062, 2001; Yoneyama *et al.*, *J Clin Invest*, 102:1933-1941, 1998).

CCL22 (MDC) es un segundo ligando para CCR4. La interacción de CCR4 con cada quimiocina produce distintos resultados (Allen *et al.*, *Annu Rev Immunol* 25:787-820, 2007; Imai *et al.*, *J Biol Chem* 273:1764-1768, 1998), posiblemente ayudado por las diferencias en las afinidades de unión de los dos ligandos para CCR4. CCL22 se une a CCR4 con mayor afinidad e induce la internalización del receptor más fácilmente que CCL17 (Baatar *et*

al., *J Immunol* 179:1996-2004, 2007; Imai *et al.*, *J Biol Chem* 273:1764-1768, 1998; Mariani *et al.*, *Eur J Immunol* 34:231-240, 2004), y promueve la adhesión celular más fácilmente que CCL17 (D'Ambrosio *et al.*, *J Immunol* 169:2303-2312, 2002). CCL22 muestra expresión más restringida con la

5 producción limitada a células inmunes, mientras que CCL17 es expresada y secretada por muchos tipos de células diferentes que incluyen células no inmunes (Alferink *et al.*, *J Exp Med* 197:585-599, 2003; Berin *et al.*, *Am J Respir Cell Mol Biol* 24:382-389, 2001; Godiska *et al.*, *J Exp Med* 185:1595-1604, 1997; Imai *et al.*, *J Biol Chem* 271:21514-21521, 1996; Saeki and

10 Tamaki, *J Dermatol Sci* 43:75-84, 2006). En el modelo de sepsis experimental de ligadura y punción cecal (CLP, por sus siglas en inglés) de murinos, CCL22 promovió inmunidad innata mientras que CCL17 pareció interferir y, en algunas circunstancias, contribuir con el daño orgánico (Matsukawa *et al.*, *Rev Immunogenet* 2:339-358, 2000). En el modelo de ratón de aspergilosis

15 pulmonar invasora, CCL22 jugó un papel de protección en la respuesta antifúngica innata mientras que CCL17 jugó un papel de supresor (Carpenter y Hogaboam, *Infect Immun* 73:7198 - 7207, 2005). Estas dos quimiocinas pueden jugar roles contrastantes para establecer la inflamación localizada debido a efectos diferenciales en la homeostasis de Treg, en que el

20 reclutamiento de Treg se favorece por CCL22 pero no por CCL17 (Heiseke *et al.*, *Gastroenterology* 142:335-345.2011; Montane *et al.*, *J Clin Invest*, 121:3024-30, 2011; Weber *et al.*, *J Clin Invest* 121:2898-2910, 2011).

En el modelo animal de hipersensibilidad por contacto, CCL17 es un factor principal al iniciar la respuesta inflamatoria que deriva en hipersensibilidad por contacto (CHS, por sus siglas en inglés) para confrontarse con cualquiera de FITC o DNFB; y la eliminación de CCL17 en estos ratones aumentó la supervivencia de aloinjertos cardíacos comparado con ratones heterocigotos que tienen un alelo CCL17 funcional (Alferink *et al.*, *J Exp Med* 197:585-599, 2003).

Los antagonistas de CCR4 pueden ser no selectivos e inhibir tanto las funciones de CCL17 como las de CCL22. Por lo tanto, persiste la necesidad de obtener anticuerpos anti-CCL17 para el tratamiento potencial de una variedad de enfermedades mediadas por CCL17 que incluyen asma.

Resumen de la invención

Una modalidad de la invención es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17 humana, que comprende una región variable de cadena pesada (VH, por sus siglas en inglés) y una región variable de cadena ligera (VL, por sus siglas en inglés), en donde el anticuerpo compete para unirse a la CCL17 humana con un anticuerpo que comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 45 y la VL de identificación de secuencia núm.: 52.

Otra modalidad de la invención es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17 humana que tiene la secuencia de identificación de secuencia núm.: 1, en donde el anticuerpo se une a la CCL17 humana al menos dentro de los residuos de aminoácidos de CCL17 21-23, 44-45 y 60-68.

Otra modalidad de la invención es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17, en donde el anticuerpo se une a CCL17 humana con una constante de afinidad (K_D) de aproximadamente 1×10^{-10} M o menos, cuando la K_D se mide mediante el uso de afinidad de equilibrio de solución reguladora salina basada en tris que contiene 0,05 % de Tween-20 después de la co-incubación del anticuerpo y CCL17 humana durante 48 horas a 4 °C.

Otra modalidad de la invención es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17 humana, que comprende ciertas secuencias de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3.

Otra modalidad de la invención es un anticuerpo aislado que se une específicamente a la CCL17 humana que comprende ciertas secuencias de VH y VL.

Otra modalidad de la invención es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17 humana, en donde el anticuerpo comprende la VH que comprende la secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la VH de identificación de secuencia núm.: 46 y la VL que comprende la secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la VL de identificación de secuencia núm.: 62.

Otra modalidad de la invención es una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptado.

Otra modalidad de la invención es un polinucleótido aislado que codifica la VH o la VL de la invención.

Otra modalidad de la invención es un vector que comprende el polinucleótido de la invención.

5 Otra modalidad de la invención es una célula huésped que comprende el vector de la invención.

Otra modalidad de la invención es un método para producir un anticuerpo de la invención, el método comprende cultivar una célula huésped de la invención en condiciones en las que se produce el anticuerpo.

10 Otra modalidad de la invención es un método para tratar una enfermedad mediada por CCL17, el método comprende administrar a un sujeto que necesite del anticuerpo de la invención durante un tiempo suficiente para tratar la enfermedad mediada por CCL17.

Otra modalidad de la invención es un método para tratar el asma o
15 la hiper-reactividad de las vías aéreas; el método que comprende administrar a un sujeto que necesite el anticuerpo de la invención durante un tiempo suficiente para tratar el asma.

Breve descripción de las figuras

20 La Figura 1A muestra la inhibición de quimiotaxis con anticuerpo anti-CCL17 B302 inducido por 1 nM de CCL17 humana en células CCRF-CEM. B302 es C17B302.

La Figura 1B muestra inhibición de quimiotaxis con anticuerpo anti-CCL17 B311 inducida por 1 nM de CCL17 humana en células CCRF-CEM. B311 es C17B311.

La Figura 1C muestra el efecto del control de isotipo IgG2 en quimiotaxis inducida por 1 nM de CCL17 humana en células CCRF-CEM.

La Figura 1D muestra el efecto del control del isotipo IgG4 en la quimiotaxis inducida por 1 nM de CCL17 humana en células CCRF-CEM.

La Figura 2A muestra la inhibición de quimiotaxis con anticuerpo anti-CCL17 B302 inducida por 1 nM de CCL17 de cyno en células HSC-F. B302 es C17B302.

La Figura 2B muestra la inhibición de quimiotaxis con anticuerpo anti-CCL17 B311 inducida por 1 nM de CCL17 de cyno en células HSC-F. B311 es C17B311.

La Figura 2C muestra el efecto del control de isotipo IgG2 en quimiotaxis inducida por 1 nM de CCL17 de cyno en células HSC-F.

La Figura 2D muestra el efecto del control de isotipo IgG4 en quimiotaxis inducida por 1 nM de CCL17 de cyno en células HSC-F.

La Figura 3 muestra las secuencias de VH de los anticuerpos anti-CCL17 que se unen a CCL17 humana con una K_D de 100 nM o inferior.

La Figura 4 muestra las secuencias de consenso de VH y HCDR de los anticuerpos anti-CCL17 mostrados en la Figura 3 que se unen a CCL17 humana con una K_D de 100 nM o inferior.

La Figura 5 muestra las secuencias de VL de los anticuerpos anti-CCL17 que se unen a CCL17 humana con una K_D de 100 nM o inferior.

La Figura 6A muestra las secuencias de consenso de VL de los anticuerpos anti-CCL17 mostrados en la Figura 5 que se unen a CCL17 humana con una K_D de 100 nM o inferior.

La Figura 6B muestra las secuencias de consenso de las secuencias de LCDR de los anticuerpos anti-CCL17 mostrados en la Figura 5 que se unen a CCL17 humana con una K_D de 100 nM o inferior.

La Figura 7 muestra los residuos del epítipo y el parátipo del anticuerpo C17B236. Los residuos del parátipo se encuentran encerrados en un cuadrado y los residuos del epítipo de CCL17 se encuentran encerrados en un círculo. Numeración de residuos de acuerdo con la identificación de secuencia núm.: 45 (VH), identificación de secuencia núm.: 52 (VL), identificación de secuencia núm.: 1 (CCL17).

Descripción detallada de la invención

Todas las publicaciones, que incluyen, pero no se limitan a, las patentes y solicitudes de patentes, citadas en esta descripción se incorporan en este documento como referencia como si se expusieran completamente.

5 Se debe entender que la terminología usada en la presente descripción tiene el propósito de describir modalidades particulares únicamente y no pretende ser limitante. A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado como lo entiende comúnmente un
10 experto en la materia a la que se dirige la invención.

Si bien en la práctica y evaluación de la presente invención se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente descripción, los materiales y métodos ilustrativos se describen en la presente descripción. En la descripción y reivindicación de la
15 presente invención se usa la siguiente terminología.

“Unión específica” o “se une específicamente” o “se une”, como se usan en la presente descripción, se refieren a la unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado con mayor afinidad que a otros antígenos. Típicamente, el anticuerpo se une a un antígeno predeterminado con una
20 constante de disociación (K_D) de aproximadamente 1×10^{-7} M o inferior, por ejemplo, aproximadamente 1×10^{-8} M o inferior, aproximadamente 1×10^{-9} M o inferior, aproximadamente 1×10^{-10} M o inferior, aproximadamente 1×10^{-11} M o inferior, aproximadamente 1×10^{-12} M o inferior, aproximadamente

1×10^{-13} M o inferior o aproximadamente 1×10^{-14} M o inferior, típicamente, con una K_D que es al menos diez veces inferior que su K_D para unirse a un antígeno no específico o epítipo (p. ej., BSA, caseína). La constante de disociación puede medirse mediante el uso de los procedimientos estándar.

- 5 Los anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno predeterminado pueden, no obstante, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo con el mismo antígeno predeterminado de otras especies (homólogos), tales como humano o mono, por ejemplo *Macaca fascicularis* (cynomolgus, cyno) o *Pan troglodytes* (chimpancé, chimp).

- 10 “Anticuerpo monoclonal que se une específicamente a CCL17 humana” se refiere a anticuerpos que se une específicamente a CCL17 maduro humano que tiene la secuencia mostrada en la identificación de secuencia núm.: 1.

- “Neutralizante” o “que neutraliza” o “anticuerpo neutralizante” como se usa en la presente descripción se relaciona con un anticuerpo o fragmentos de anticuerpo que inhibe parcial o completamente, por cualquier mecanismo, la actividad biológica de CCL17. Los anticuerpos neutralizantes se pueden identificar por medio del uso de ensayos para la actividad biológica de CCL17 como se describe más abajo. Los anticuerpos neutralizantes de CCL17 pueden inhibir la actividad biológica medida de CCL17 en 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

“CCL17 humana” o “huCCL17” como se usan indistintamente en la presente descripción se refieren a la proteína CCL17 humana que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la identificación de secuencia núm.:

1. La secuencia de CCL17 de longitud completa que incluye la secuencia de señal está disponible en GenBank; Número de acceso NP_002978.

“CCL17 de cyno” o “CCL17c” como se usan indistintamente en la presente descripción se refiere a la proteína CCL17 de *Macaca fascicularis* (cyno) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la identificación de secuencia núm.: 2.

“Anticuerpos” como se usa en la presente descripción se usa en un sentido amplio e incluye moléculas de inmunoglobulina que incluyen anticuerpos monoclonales que incluyen anticuerpos murinos, humanos, humanizados y quiméricos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos formados de por lo menos dos anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpos, anticuerpos diméricos, tetraméricos o multiméricos, anticuerpos de cadena simple, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida.

Las inmunoglobulinas se pueden asignar a cinco clases principales, denominadas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, en dependencia de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada. La IgA e IgG se subclasifican adicionalmente como isotipos IgA₁, IgA₂, IgG₁, IgG₂, IgG₃ y IgG₄. Las cadenas ligeras de anticuerpo de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos evidentemente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

El término “fragmentos de anticuerpo” se refiere a una parte de una molécula de una inmunoglobulina que retiene el sitio de unión al antígeno de cadena pesada y/o cadena ligera, tal como las regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1, 2 y 3, las regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) 1, 2 y 3, una región variable de la cadena pesada (VH), o una región variable de la cadena ligera (VL). Los fragmentos de anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en la VL o la VH; un fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que comprende los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento de dAb (Ward et al., Nature 341:544- 546, 1989), que consiste en un dominio VH. Los dominios VH y VL pueden diseñarse y enlazarse a través de un enlazador sintético para formar varios tipos de diseños de anticuerpos de una sola cadena, en donde los dominios VH/VL se asocian intramolecularmente, o intermolecularmente en los casos en que los dominios VH y VL se expresan por construcciones de anticuerpos cadenas individuales separadas, para formar un sitio de unión al antígeno monovalente, tal como el Fv de una sola cadena (scFv) o diacuerpo; descrito, por ejemplo, en la publicación de patente internacional núm. WO1998/44001, publicación de la patente internacional núm. WO1988/01649; publicación de la patente internacional núm. WO1994/13804; publicación de la patente internacional núm. WO1992/01047. Estos fragmentos de

anticuerpos se obtienen por medio del uso de técnicas conocidas y los fragmentos se caracterizan de la misma forma que los anticuerpos intactos.

La frase “anticuerpo aislado” se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17 humana está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de CCL17 humana). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17 humana puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como ortólogos de CCL17 humana, tal como CCL17 de *Macaca fascicularis* (cynomolgus). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

Una región variable de anticuerpo consiste en una región de “marco” interrumpida por tres sitios de “unión al antígeno”. Los sitios de unión a antígeno se definen por medio del uso de varios términos: (i) Las regiones de determinación de complementariedad (CDR), tres en la VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3), y tres en la VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), están basadas en la variabilidad de la secuencia (Wu y Kabat, *J Exp Med* 132:211-50, 1970; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ta ed. Servicio de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md., 1991). (ii) “Regiones hipervariables”, “HVR”, o “HV”, tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3), se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en estructura, tal como lo definen Chothia y Lesk (Chothia y Lesk,

Mol Biol 196:901-17, 1987). Otros términos incluyen “IMGT-CDRs” (Lefranc *et al.*, *Dev Comparat Immunol* 27:55-77, 2003) y “Uso de residuos determinantes de la especificidad” (SDRU) (Almagro, *Mol Recognit* 17:132-43, 2004). The International ImMunoGeneTics (IMGT) database ([http://www_imgt_org](http://www.imgt.org)) presenta una numeración estandarizada y definición de sitios de unión a antígenos. La correspondencia entre las delineaciones de CDR, HV e IMGT se describe en Lefranc *et al.*, *Dev Comparat Immunol* 27:55-77, 2003.

“Residuos de Chothia”, como se usa en la presente descripción, son los residuos de VL y VH de anticuerpo numerados de acuerdo con Al-Lazikani (Al-Lazikani *et al.*, *J Mol Biol* 273:927-48, 1997).

“Marco” o “secuencias marco” son las secuencias restantes de una región variable diferente de aquellas secuencias definidas para ser sitios de unión al antígeno. Debido a que el sitio de unión al antígeno se puede definir por diversos términos como se describió anteriormente, la secuencia de aminoácidos exacta de un marco depende de cómo se definió el sitio de unión al antígeno.

“Anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo en que el sitio de unión al antígeno se deriva a partir de especies no humanas y los marcos de la región variable se derivan a partir de secuencias de inmunoglobulinas humanas. Los anticuerpos humanizados pueden incluir sustituciones en las regiones de marco de manera que el marco puede no ser una copia exacta de secuencias expresadas de inmunoglobulina humana o de líneas germinales de genes.

“Anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables de cadena pesada y ligera en que tanto el marco como las

regiones de unión al antígeno se derivan a partir de secuencias de origen humano. Si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante además se deriva a partir de secuencias de origen humano.

El anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que se “derivan a partir de” secuencias de origen humano si las regiones variables del anticuerpo se obtienen a partir de un sistema que usa inmunoglobulina de línea germinal humana o genes de inmunoglobulinas reordenados. Tales sistemas incluyen genotecas de genes de inmunoglobulinas humanas, por ejemplo, genotecas expuestas en fagos, y animales transgénicos no humanos tales como ratones portadores del locus de inmunoglobulinas humanas descritas en la presente descripción. “Anticuerpo humano” puede contener diferencias de aminoácidos cuando se compara con las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana o reordenada debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas de origen natural o introducción intencional de sustituciones. Típicamente, “anticuerpo humano” es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico en secuencia de aminoácido con una secuencia de aminoácidos codificada por una línea germinal humana o gen de inmunoglobulina reordenado. En algunos casos, el “anticuerpo humano” puede contener secuencias de marco de consenso derivadas a partir del análisis de secuencia de marco humano, por ejemplo las descritas en Knappik *et al.*, *J Mol Biol* 296:57-86, 2000), o el HCDR3 sintético incorporado en la genoteca de genes de inmunoglobulinas humanas expuestas

en fagos, por ejemplo las descritas en Shi *et al.*, *J Mol Biol* 397:385-96, 2010 y la publicación de patente internacional núm. WO2009/08546).

Los anticuerpos humanizados aislados pueden ser sintéticos. Los anticuerpos humanos, en tanto que se derivan a partir de secuencias de inmunoglobulinas humanas, se pueden generar por medio del uso de sistemas tales como la exposición en fagos que contienen CDR sintéticos y/o marcos sintéticos, o se pueden someter a mutagénesis *in vitro* para mejorar las propiedades del anticuerpo, lo que resulta en anticuerpos que no existen de manera natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Los anticuerpos humanos pueden incluir sustituciones en el marco o en el sitio de unión al antígeno de manera que pueden no ser copias exactas de secuencias expresadas de inmunoglobulina humana o de genes de líneas germinales. No obstante, los anticuerpos en los que los sitios de unión a antígenos se derivan de una especie no humana no se incluyen en la definición de “anticuerpo humano”.

El término “anticuerpo recombinante”, como se usa en la presente descripción, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como los anticuerpos aislados a partir de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico o transcromosomal para los genes de inmunoglobulinas humanas o un hibridoma preparado de ahí (descrito adicionalmente más abajo), los anticuerpos aislados a partir de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, los

anticuerpos aislados a partir de una genoteca de anticuerpo combinatoria recombinante y los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por cualquier otro medio que implica el corte de las secuencias de genes de inmunoglobulinas humanas a otras secuencias de ADN.

5 El término “anticuerpo monoclonal” como se usa en la presente descripción se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una sola composición molecular.

El término “substancialmente idéntico” como se usa en la presente descripción significa que las secuencias de aminoácidos de la región variable de
10 los dos anticuerpos que se comparan son idénticas o tienen “diferencias insustanciales”. Diferencias insustanciales son sustituciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una secuencia de región variable de un anticuerpo que no afecta adversamente las propiedades del anticuerpo. Las secuencias de aminoácidos sustancialmente idénticas a las secuencias de
15 región variable descritas en la presente descripción están dentro del alcance de la invención. En algunas modalidades, la identidad de secuencia puede ser de aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más. El porcentaje de identidad puede determinarse, por ejemplo, por alineación de pares por medio del uso de las posiciones predeterminadas del
20 módulo AlignX del vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las secuencias de proteína de la presente invención pueden usarse como una secuencia de consulta para realizar una búsqueda en bases de datos públicas o de patentes para identificar, por ejemplo, secuencias relacionadas. Los programas ilustrativos

usados para realizar tales búsquedas son los programas XBLAST o BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), o el juego GenomeQuest™ (GenomeQuest, Westborough, MA) por medio del uso de los parámetros predeterminados.

El término “epítopo”, como se usa en la presente descripción, significa
5 una porción de un antígeno a la cual se une específicamente un anticuerpo.

Usualmente, los epítopos consisten en agrupaciones superficiales

químicamente activas (tales como polares, no polares o hidrófobas) de

entidades tales como aminoácidos o cadenas laterales de polisacáridos y

pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, así

10 como características de carga específicas. Un epítopo puede estar compuesto

de aminoácidos contiguos y/o discontiguos que forman una unidad espacial

conformacional. En un epítopo discontiguo, los aminoácidos de porciones

diferentes de la secuencia lineal del antígeno están muy próximos en espacio

tridimensional a través del plegado de la molécula de proteína.

15 “Biespecífico”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un anticuerpo o a una molécula que une dos antígenos distintos o dos epítopos distintos en un antígeno.

Como se usa en la presente descripción, “monospecífico” se refiere a un anticuerpo que se une a un antígeno o a un epítopo.

20 El término “en combinación con” como se usa en la presente descripción denota que los agentes descritos se pueden administrar a un animal juntos en una mezcla, simultáneamente como agentes únicos o en forma secuencial como agentes únicos en cualquier orden.

El término “vector” se refiere a un polinucleótido no natural con la capacidad de duplicarse dentro de un sistema biológico o que puede moverse entre dichos sistemas. Los polinucleótidos de vectores contienen, típicamente, un ADNc que codifica una proteína de interés y elementos adicionales tales como orígenes de replicación, señal de poliadenilación o marcadores de selección, que funcionan para facilitar la duplicación o mantenimiento de esos polinucleótidos en un sistema biológico. Los ejemplos de esos sistema biológicos pueden incluir una célula, virus, animal, planta, y sistema biológicos reconstituidos que usan componentes biológicos capaces de duplicar un vector. El polinucleótido que comprende un vector puede ser moléculas de ADN o ARN o un híbrido de estas.

El término “vector de expresión” significa un vector que puede usarse en un sistema biológico o en un sistema biológico reconstituido para dirigir la traducción de un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótidos presente en el vector de expresión.

El término “polinucleótido” significa una molécula que comprende una cadena de nucleótidos enlazados covalentemente por una estructura de la base de azúcares y fosfatos u otra manera de enlace químico covalente equivalente. Los ADN y ARN de una hebra y de hebra doble son ejemplos típicos de polinucleótidos.

“ADN complementario” o “ADNc” se refiere a un polinucleótido sintético bien conocido que comparte el arreglo de elementos de secuencia que se encuentran en especies de ARNm maduro nativo con exones

contiguos, con los intrones intermedios presentes en el ADN genómico eliminados. Los codones que codifican la metionina iniciadora pueden o no estar presentes en el ADNc. El ADNc puede sintetizarse, por ejemplo, por transcripción inversa o ensamble del gen sintético.

- 5 “Sintético” o “no-natural”, como se usa en la presente descripción, se refiere a un polinucleótido o una molécula de polipéptido que no está presente en la naturaleza.

El término “polipéptido” o “proteína” significa una molécula que comprende al menos dos residuos de aminoácido enlazados por un enlace
10 peptídico para formar un polipéptido. Los polipéptidos pequeños de una cantidad menor que 50 aminoácidos podrían denominarse “péptidos”.

En la presente descripción se usan códigos para aminoácidos de una y tres letras convencionales como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1.

15	Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra
	Alanina	Ala	A
	Arginina	Arg	R
	Asparagina	Asn	N
	Aspartato	Asp	D
	Cisteína	Cys	C
20	Glutamato	Glu	E
	Glutamina	Gln	Q
	Glicina	Gly	G
	Histidina	His	H
	Isoleucina	Ile	I

Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Composiciones de materia

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a CCL17 humana. Los anticuerpos de la invención inhiben la actividad biológica de CCL17 en la célula, y, opcionalmente, puede tener reacción cruzada con CCL17 de cyno. La presente invención proporciona polinucleótidos sintéticos que codifican los anticuerpos y fragmentos de estos, vectores y células huésped, y métodos para elaborar y usar los anticuerpos de la invención.

Una modalidad de la invención es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17 humana.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17 humana, que comprende una región variable de cadena pesada (VH, por sus siglas en inglés) y una región variable de cadena ligera (VL, por sus siglas en inglés), en donde el anticuerpo compite para unirse a la CCL17 humana con un

anticuerpo que comprende la VH de identificación de secuencia núm.:45 y la VL de identificación de secuencia núm.: 52.

La competición entre la unión específica a la CCL17 humana con anticuerpos de la invención que comprenden ciertas secuencias de aminoácido de VH y VL pueden ensayarse in vitro por medio del uso de métodos conocidos. Por ejemplo, la unión del anticuerpo etiquetado con éster MSD Sulfo-Tag™ a la CCL17 humana en presencia de un anticuerpo no etiquetado puede evaluarse mediante análisis ELISA, o Biacore o mediante citometría de flujo para demostrar la competición con los anticuerpos de la presente invención. La habilidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión del anticuerpo que comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 45 y la VL de la identificación de secuencia núm.: 52 a la CCL17 humana demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con estos anticuerpos para unirse a la CCL17 humana.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17 humana que tiene la secuencia de identificación de secuencia núm.: 1, en donde el anticuerpo se une a la CCL17 humana al menos dentro de los residuos de aminoácidos de CCL17 21-23, 44-45 y 60-68. “Por lo menos dentro de los residuos de aminoácidos de CCL17 humana 21-23, 44-45 y 60 - 68” significa que el anticuerpo anti-CCL17 se une a por lo menos un residuo que se encuentra dentro del tramo de residuos de aminoácidos 21 - 23 de la identificación de secuencia núm.: 1, y al menos un residuo que reside dentro del tramo de residuos de aminoácido 44-45 de la

identificación de secuencia núm.: 1, y al menos un residuo que reside dentro del tramo de residuos de aminoácido 60-68 de la identificación de secuencia núm.:

1. El anticuerpo puede unir más de un residuo dentro de los residuos 21-23, 44-45 y 60-68, y los residuos adicionales fuera de los residuos 21-23, 44-45 y 60-68

5 de identificación de secuencia núm.: 1.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo se une a la CCL17 humana en al menos los residuos R22 y K23 de identificación de secuencia núm.: 1.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el
10 anticuerpo se une a la CCL17 humana en al menos los residuos L21, R22, K23, V44, Q45, N60, Y64, S67 y L68 de identificación de secuencia núm.: 1.

Un anticuerpo ilustrativo que se une a la CCL17 humana dentro de los residuos de aminoácidos de CCL17 21-23, 44-45 y 60-68 de la identificación de secuencia núm.: 1 es C17B236 que tiene VH de identificación de secuencia
15 núm.: 45 y VL de identificación de secuencia núm.: 52. Basado en análisis de estructura cristalina, los residuos de epítomo principales unidos por C17B236 son R22 y K23 de CCL17 de identificación de secuencia núm.: 1, basado en el número de contactos entre estos residuos y los residuos de VH de anticuerpos.

Otros anticuerpos ilustrativos que se unen a CCL17 dentro de residuos
20 de aminoácidos de CCL17 21-23, 44-45 y 60-68 son variantes maduras por afinidad de C17B236, cuya totalidad de anticuerpos se derivan de la campaña de maduración por afinidad del mismo anticuerpo parental. Las secuencias de VH y VL de los anticuerpos ilustrativos se muestran en la Figura 3 y en la

Figura 5. La maduración por afinidad de anticuerpos implica, por lo general, las sustituciones de aminoácidos en las CDR o en la zona de Vernier (regiones de marco que subrayan las CDR). Las variantes maduras se seleccionan al elegir las genotecas combinatorias, que pueden contener hasta 10^8 mutantes. La
5 tapa en el tamaño de la genoteca limita el número de posiciones variables a 6-7, si se permiten los 20 aminoácidos en cada posición. La mayoría de los residuos de parátomos se conservan en cada genoteca combinatoria, la cual asegura que el epítipo de unión esté, además, conservado. Varios estudios cristalográficos de los anticuerpos parentales y maduros han mostrado que el
10 epítipo siempre se conserva durante la maduración por afinidad (p. ej., Fransson et al., J. Mol. Biol. 2010, 398:214-231; Gustchina et al., PLoS Pathog. 2010, 6:e1001182; La Porte et al., MAbs 2014; 6:1059-1068).

Los anticuerpos anti-CCL17 que se unen a CCL17 humana dentro de los residuos de aminoácidos de CCL17 21-23, 44-45 y 60-68 se unen a
15 CCL17 humana con alta afinidad, típicamente, con la K_D inferior a aproximadamente 1×10^{-10} M.

Los anticuerpos que se unen a CCL17 humana dentro de los residuos de aminoácidos de CCL17 21-23, 44-45 y 60-68 pueden elaborarse, por ejemplo, al inmunizar ratones con la proteína quimérica
20 CCL17 que tiene secuencias de CCL17 humana en las posiciones de residuos 21-23, 44-45 y 60-68, o al seleccionar genotecas de presentación de fagos con CCL17 humana silvestre, y al realizar un análisis cruzado de las coincidencias resultantes con variantes de CCL17 que tienen

sustituciones en cada posición de residuo o en varias posiciones de residuos dentro de los residuos 21-23, 44-45 y 60-68 de CCL17 humana mediante el uso de los métodos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades de la invención descrita en la presente descripción, el anticuerpo que se une específicamente a CCL17 humana bloquea la interacción CCL17/CCR4.

Los anticuerpos pueden ensayarse para comprobar su capacidad de bloquear la interacción de CCL17/CCR4 mediante una citometría de flujo estándar. Por ejemplo, las células que expresan CCR4 se incuban con CCL17 humana etiquetada fluorescentemente y el anticuerpo de prueba, después de lo cual la unión de la CCL17 humana etiquetada fluorescentemente sobre células que expresan CCR4 se evalúa mediante el uso de métodos estándar. Los anticuerpos que “bloquean la interacción de CCL17/CCR4” o “inhiben la interacción de CCL17/CCR4” pueden inhibir la unión de CCL17 a células que expresan CCR4 por 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % cuando se comparan con la unión de CCL17 en ausencia del anticuerpo.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17, en donde el anticuerpo se une a CCL17 humana con una constante de afinidad (K_D) de aproximadamente 1×10^{-7} M o inferior, de aproximadamente 1×10^{-8} M o inferior, aproximadamente 1×10^{-9} M o inferior, aproximadamente 1×10^{-10} M o inferior, aproximadamente 1×10^{-11} M o inferior, aproximadamente 1×10^{-12} M o inferior,

aproximadamente 1×10^{-13} M o inferior, o aproximadamente 1×10^{-14} M o inferior, cuando la K_D se mide mediante el uso de afinidad de equilibrio de solución reguladora salina basada en tris que contiene 0,05 % de Tween-20 después de la co-incubación del anticuerpo y la CCL17 humana durante 48 horas a 4 °C.

5 En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo se une a CCL17 humana con una constante de afinidad (K_D) de aproximadamente 1×10^{-10} M o inferior, cuando la K_D se mide mediante el uso de afinidad de equilibrio de solución reguladora salina basada en tris que contiene 0,05 % de Tween-20 después de la co-incubación del
10 anticuerpo y CCL17 humana durante 48 horas a 4 °C.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo se une a la CCL17 humana con la K_D de aproximadamente 5×10^{-12} M o inferior.

En otra modalidad descrita en la presente descripción, el anticuerpo
15 de la invención que se une específicamente a CCL17 humana se une a *Macaca fascicularis* (cyno) con una constante de afinidad (K_D) de aproximadamente 1×10^{-6} M o inferior, aproximadamente 1×10^{-7} M o inferior, aproximadamente 1×10^{-8} M o inferior, aproximadamente 1×10^{-9} M o inferior, aproximadamente 1×10^{-10} M o inferior, aproximadamente 1×10^{-11} M o inferior
20 o aproximadamente 1×10^{-12} M o inferior, cuando la K_D se mide utilizando afinidad de equilibrio de solución en solución reguladora basada en tris que contiene 0,05 % de Tween-20 después de la co-incubación del anticuerpo y CCL17 de cyno durante 48 horas a 4 °C.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo de la invención se une a CCL17 de *Macaca fascicularis* (cyno) con la K_D de aproximadamente 1×10^{-8} M o inferior, cuando la K_D se mide mediante el uso de afinidad de equilibrio de solución reguladora salina basada en tris que contiene 0,05 % de Tween-20 después de co-incubación del anticuerpo y CCL17 de cyno durante 48 horas a 4 °C.

La afinidad de un anticuerpo con CCL17 humana que tiene la secuencia de identificación de secuencia núm.: 1 o CCL17 de cyno que tiene la secuencia de identificación de secuencia núm.: 2 puede medirse experimentalmente mediante el uso de cualquier método adecuado. Tales métodos pueden usar instrumentación Biacore o KinExA, tal como ProteOn XPR36 o Biacore 3000, afinidad de equilibrio de solución (SEA, por sus siglas en inglés), ELISA o ensayos de unión competitiva conocidos por aquellos con experiencia en la materia. Los métodos ilustrativos son los que se describen en el Ejemplo 3. La afinidad medida de una interacción anticuerpo/CCL17 particular puede variar, si se mide en condiciones diferentes (p. ej., osmolaridad, pH, solución reguladora, concentrador de detergente). Así, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión (p. ej., K_D , K_{on} , K_{off}) se realizan preferentemente con condiciones estandarizadas y una solución reguladora estandarizada, tal como la solución reguladora descrita en la presente descripción. Los expertos en la materia apreciarán que el error interno para las mediciones de afinidad, por ejemplo, que usa la afinidad de equilibrio de solución, Biacore 3000 o ProteOn (medido como desviación estándar, SD) puede estar típicamente, entre 5-33 % para las

mediciones dentro de los límites típicos de detección. Por lo tanto, el término “aproximadamente” refleja la desviación estándar típica en el ensayo. Por ejemplo, la SD típica para una K_D de 1×10^{-9} M es hasta $\pm 0,33 \times 10^{-9}$ M.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17 humana, en donde el anticuerpo inhibe la actividad biológica de la CCL17.

“Actividad biológica de CCL17” como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier actividad que ocurre como resultado de la unión de CCL17 a su receptor CCR4. Una actividad biológica de CCL17 ilustrativa resulta en movilización de calcio intracelular o quimiotaxis de células, por ejemplo, células CCRF-CEM (línea celular de linfocitos T de pacientes con leucemia aguda). Los anticuerpos de la invención se pueden probar en cuanto a su capacidad para inhibir la actividad biológica de CCL17 mediante el uso de métodos estándar y los descritos en la presente descripción. Por ejemplo, la capacidad de los anticuerpos de la invención para inhibir la movilización de calcio intracelular dependiente de CCL17 se puede ensayar por la medición del efecto de los anticuerpos sobre la movilización de calcio inducida por CCL17 usando colorantes fluorescentes tales como Fluo-8 NW, Fluo-4 AM o Fluo-3 AM. La capacidad de los anticuerpos de la invención para inhibir la quimiotaxis inducida por CCL17 puede medirse al medir la migración de células CCRF-CEM a través de un filtro semipermeable de $5 \mu\text{M}$ en un sistema de cultivo de dos cámaras y al medir la viabilidad de células migradas por el filtro. Los anticuerpos de la invención pueden inhibir la actividad biológica de CCL17 por

aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es un anticuerpo que se une específicamente a CCL17, en donde el anticuerpo inhibe 10 ng/ml de movilización de calcio inducida por CCL17 humana medido mediante el uso de Fluo-8 NW con un valor de IC_{50} de aproximadamente 1×10^{-7} M o inferior, aproximadamente 1×10^{-8} M o inferior, o aproximadamente 1×10^{-9} M o inferior.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es un anticuerpo que se une específicamente a CCL17, en donde el anticuerpo comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR, por sus siglas en inglés) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) y 3 (HCDR3) y regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR, por sus siglas en inglés) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) y 3 (LCDR3), en donde la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 4, 5, 71, 72, 73 y 74, respectivamente.

Los anticuerpos que comprenden las secuencias de HCDR y de LCDR de identificación de secuencia núm.: 4, 5, 71, 72, 73 y 74 se unen a CCL17 humana con una K_D de 1×10^{-10} o inferior.

HCDR1: SYWIG (identificación de secuencia núm.: 4)

HCDR2: IIDPSDSDTRYSPSFQG (identificación de secuencia núm.: 5)

secuencia de consenso de HCDR3

VGPADVWDX₁FDY (identificación de secuencia núm.: 71),

5 en donde

X₁ es S, A o T

secuencia de consenso de LCDR1:

KSSQSVLX₁SX₂X₃NX₄NX₅LA (identificación de secuencia núm.: 72),

10 en donde

X₁ es L, Y, S o N;

X₂ es F, P, H o I;

X₃ es D, Y, W, T o V;

X₄ es I, F, S, T, Y, N, K o V; y

15 X₅ es K, A, Q, T o D.

secuencia de consenso de LCDR2:

X₁ASTRE (identificación de secuencia núm.: 73),

en donde

20 X₁ es N, H, G, E, T o D.

secuencia de consenso de LCDR3

QQX₁X₂X₃X₄PX₅T (identificación de secuencia núm.: 74);

en donde

X_1 es F, Y, T o H;

X_2 es Y, L, N o W;

X_3 es S, A, L, I, T, Q o H;

5 X_4 es V, T, I, Y, L o D; y

X_5 es S, F, A o L.

En alguna modalidad descrita en la presente descripción, la HCDR1 comprende la secuencia de identificación de secuencia núm.: 4, la HCDR2
10 comprende la secuencia de identificación de secuencia núm.: 5 y la HCDR3 comprende la secuencia de identificación de secuencia núm.: 6, 42, 43 o 44 en el anticuerpo de la invención que se une específicamente a CCL17.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de
15 secuencia núm.: 4, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 5 y la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 6, 42 o 43.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la LCDR1 comprende la secuencia de identificación de secuencia núm.: 7, 8,
20 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18; la LCDR2 comprende la secuencia de identificación de secuencia núm.: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 39, 40 o 41; y la LCDR3 comprende la secuencia de identificación de secuencia núm.:

27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 o 38 en el anticuerpo de la invención que se une específicamente a CCL17.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de
 5 secuencia núm.: 8, 9, 10, 13, 14, 15, 17 o 18, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 20, 21, 22, 24, 25 y 26 y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 28, 29, 30, 33, 34, 35, 37 o 38.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el
 10 anticuerpo que se une específicamente a CCL17 comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 75 y la VL de identificación de secuencia núm.: 76.

secuencia de consenso de VH (identificación de secuencia núm.: 75)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI

15 IDPSDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVGP

ADVWDX₁FDYWGQGTLVTVSS

en donde

X₁ es S, A o T.

20 secuencia de consenso de VL (identificación de secuencia núm.: 76):

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLX₁SX₂X₃NX₄NX₅LAWYQQKPGQ

PPKLLIYX₆ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQX₇X₈

X₉X₁₀PX₁₁TFGQGTKVEIK; en donde

X_1 es L, Y, S o N;

X_2 es F, P, H o I;

X_3 es D, Y, W, T o V;

X_4 es I, F, S, T, Y, N, K o V;

5 X_5 es K, A, Q, T o D;

X_6 es N, H, G, E, T o D;

X_7 es F, Y, T o H;

X_8 es Y, L, N o W;

X_9 es S, A, L, I, T, Q o H;

10 X_{10} es V, T, I, Y, L o D; y

X_{11} es S, F, A o L.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo que se une específicamente a CCL17 comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 45, 46, 47 o 48.

15 En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo que se une específicamente a CCL17 comprende la VL de identificación de secuencia núm.: 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65 o 66.

20 En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo que se une específicamente a CCL17 comprende la VH de secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 45, 46 o 47.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo que se une específicamente a CCL17 comprende la VL de

secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 50, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60 o 62.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17, en donde el anticuerpo comprende secuencias de HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 7, 19 y 27, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 8, 20 y 28, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 9, 21 y 29, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 10, 22 y 30, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 11, 23 y 31, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 12, 24 y 32, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 13, 21 y 33, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 14, 20 y 34, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 15, 25 y 35, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 16, 21 y 36, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 17, 25 y 37, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 18, 26 y 38, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 8, 39 y 28, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 8, 24 y 28, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 8, 22 y 28, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 8, 40 y 28, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 8, 26 y 28, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 8, 41 y 28, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 42, 8, 24 y 28, respectivamente;

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 43, 8, 24 y 28, respectivamente; o

sec. con núm. de ident.: 4, 5, 44, 8, 24 y 28, respectivamente.

5 Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17, en donde el anticuerpo comprende

la VH de la identificación de secuencia núm.: 45 y la VL de identificación de secuencia núm.: 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 58, 59, 60, 61, 62, 63,

10 64, 65 o 66;

la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 46 y 62, respectivamente;

la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 47 y 62, respectivamente; o

15 la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 48 y 62, respectivamente.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17, en donde el anticuerpo comprende

20 la VH de la identificación de secuencia núm.: 45 y la VL de identificación de secuencia núm.: 50, 51, 52, 55, 56, 57, 59 o 60; la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 46 y 62, respectivamente; o

la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 47 y 62,
respectivamente.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es
un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17, en donde el
5 anticuerpo comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 45 y la VL
de identificación de secuencia núm.: 50.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es
un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17, en donde el
anticuerpo comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 45 y la VL
10 de identificación de secuencia núm.: 51.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es
un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17, en donde el
anticuerpo comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 45 y la VL
de identificación de secuencia núm.: 52.

15 Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es
un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17, en donde el
anticuerpo comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 45 y la VL
de identificación de secuencia núm.: 55.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es
20 un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17, en donde el
anticuerpo comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 45 y la VL
de identificación de secuencia núm.: 56.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17, en donde el anticuerpo comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 45 y la VL de identificación de secuencia núm.: 57.

5 Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17, en donde el anticuerpo comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 45 y la VL de identificación de secuencia núm.: 59.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción
10 es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17, en donde el anticuerpo comprende VH de identificación de secuencia núm.: 45 y la VL de identificación de secuencia núm.: 60.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17, en donde el
15 anticuerpo comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 46 y la VL de identificación de secuencia núm.: 62.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17, en donde el anticuerpo comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 47 y la VL
20 de identificación de secuencia núm.: 62.

Otra modalidad de la invención descrita en la presente descripción es un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17, en donde el anticuerpo comprende la VH que comprende la secuencia de aminoácidos al menos 90 %,

91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la VH de identificación de secuencia núm.: 46 y la VL que comprende la secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la VL de identificación de secuencia núm.: 62.

5 Los anticuerpos ilustrativos son anticuerpos mostrados en la Tabla 9.

Los anticuerpos cuyas secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada, CDR de cadena ligera, VH o VL difieren de manera no sustancial de los mostrados en las Tablas 3, 4, 6, 7 y 9 están incluidos en el alcance de la invención. Típicamente, esto involucra una o más

10 sustituciones conservadoras de aminoácidos con un amino ácido que tiene características de carga, hidrofóbicas, o estereoquímicas similares en el sitio de unión al antígeno o en el marco sin alterar adversamente las propiedades del anticuerpo. Las sustituciones conservadoras pueden efectuarse para mejorar las propiedades del anticuerpo, por ejemplo, estabilidad o afinidad.

15 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 sustituciones de aminoácidos pueden realizarse a la secuencia de VH o VL. Por ejemplo, una “sustitución conservadora de aminoácidos” puede comprender una sustitución de un residuo nativo de aminoácido por un residuo no nativo para que haya poco o ningún efecto en la polaridad o la carga del residuo de aminoácido en esta
20 posición. Además, cualquier residuo nativo del polipéptido puede sustituirse, además, con alanina, como se describió anteriormente para la mutagénesis por barrido de alanina (MacLennan *et al* (1998) *Act Physiol. Scand. Suppl.* 643:55-67; Sasaki *et al* (1998) *Adv. Biopsy's.* 35:1-24). Las sustituciones de

aminoácidos deseadas pueden determinarse por aquellos con experiencia en la materia en el momento en que se desean tales sustituciones. Por ejemplo, se puede usar sustituciones de aminoácidos para identificar residuos importantes de la secuencia molecular, o para aumentar o

5 disminuir la afinidad de las moléculas descritas en la presente descripción.

Los siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras de aminoácidos entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina
10 (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofan (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (ver, e. g., Creighton, *Proteins* (1984)).

Las sustituciones de aminoácidos pueden hacerse, por ejemplo, mediante mutagénesis por PCR (patente de EE. UU. núm. 4.683.195). Las genotecas de variantes se pueden generar por medio del uso de métodos
15 bien conocidos, por ejemplo por medio del uso de codones aleatorios (NNK) o no-aleatorios, por ejemplo, codones DVK, que codifican 11 aminoácidos (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp) y el análisis de genotecas para variantes con propiedades deseadas.

Aunque las modalidades ilustradas en los Ejemplos comprenden
20 pares de regiones variables, una de una cadena pesada y una de una cadena ligera, un técnico con experiencia reconocerá que las modalidades alternativas pueden comprender regiones variables simples de la cadena pesada o ligera. La región variable simple se puede usar para rastrear

dominios variables capaces de formar un fragmento de unión al antígeno específico y de dos dominios capaz de, por ejemplo, unirse a CCL17 humana que tiene la secuencia de identificación de secuencia núm.: 1. El análisis puede realizarse por métodos de análisis de exhibición de fagos mediante el uso de, por ejemplo, el enfoque combinatorio dual jerárquico descrito en la publicación de patente internacional núm. WO1992/01047. En este enfoque, se usa una colonia individual que contiene un clon de la cadena H o L para infectar una genoteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H), y el dominio de unión al antígeno obtenido, específico y de doble cadena, se selecciona de acuerdo con técnicas de exhibición de fagos tal como las descritas. Por lo tanto las cadenas de polipéptidos de VH y VL individuales son útiles para identificar anticuerpos adicionales que se unen específicamente a CCL17 humana que tienen la identificación de secuencia núm.: 1 mediante el uso de los métodos descritos en la publicación de patente internacional núm. WO1992/01047.

Los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción pueden hacerse mediante el uso de una variedad de tecnologías para generar anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, puede usarse el método de hibridoma de Kohler y Milstein, *Nature* 256:495, 1975. En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped, tal como un hámster, una rata o un mono, se inmuniza con proteína CCL17 humana y/o proteína CCL17 de cyno o con fragmentos de estas proteínas, tal como una porción extracelular de CCL17 humana, seguido de fusión de células de bazo de animales inmunizados con células de mieloma

por medio del uso de métodos estándar para formar células de hibridoma (Gooding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Las colonias que surgen a partir de células de hibridoma inmortalizadas sencillas se evalúan en cuanto a la producción de anticuerpos con propiedades deseadas, tales como especificidad de unión, reactividad cruzada o falta de esta, y afinidad para el antígeno.

Pueden usarse varios animales huéspedes para producir anticuerpos contra CCL17 humana. Por ejemplo, pueden usarse ratones Balb/c para generar anticuerpos de CCL17 anti-humana. Los anticuerpos hechos en ratones Balb/c y otros animales no humanos pueden humanizarse mediante el uso de varias tecnologías para generar más secuencias similares a las humanas. Las técnicas de humanización ilustrativas que incluyen la selección de marcos aceptores humanos son conocidos en la materia e incluyen injertos de CDR (patente de los EE. UU. núm. 5.225.539), injerto de SDR (patente de los EE. UU. núm. 6.818.749), sustitución de la superficie (Palin, *Mol Immunol* 28:489-499, 1991), sustitución de la superficie de residuos de determinación de especificidad (publicación de patente de los EE. UU. núm. 2010/0261620), adaptación a humano (o adaptación a marco humano) (publicación de patente de los EE. UU. núm. US2009/0118127), super-humanización (patente de los EE. UU. núm. 7.709, 226) y selección guiada (Osborn *et al.*, *Methods* 36:61-68, 2005; patente de los EE. UU. núm. 5.565.332).

Los anticuerpos humanizados pueden optimizarse aún más para mejorar su selectividad o afinidad con un antígeno deseado al incorporar

residuos de soporte de marco alterados para conservar la afinidad de unión (mutaciones inversas) mediante técnicas descritas en la publicación de patente internacional núm. WO1990/007861 y en la publicación de patente internacional núm. WO1992/22653.

5 Pueden usarse ratones transgénicos que portan en su genoma loci de inmunoglobulina humana para generar anticuerpos humanos contra una proteína objetivo, y se describen, por ejemplo, en la publicación de patente internacional núm. WO1990/04036, la patente de EE. UU. núm. 6.150.584, la publicación de patente internacional núm. WO1999/45962, publicación de la patente

10 internacional núm. WO2002/066630, publicación de la patente internacional núm. WO2002/43478, Loner *et al.*, *Nature* 368:856-9, 1994; Green *et al.*, *Nature Genet.* 7:13-21, 1994; Green y Jakobovits *Exp Med* 188:483-95, 1998; Lonberg y Huszar *Int Rev Immunol* 13:65-93, 1995; Bruggemann *et al.*, *Eur J Immunol* 21:1323-1326, 1991; Fishwild *et al.*, *Nat Biotechnol* 14:845-851, 1996; Mendez *et*

15 *al.*, *Nat Genet* 15:146-156, 1997; Green, *J Immunol Methods* 231:11-23, 1999; Yang *et al.*, *Cancer Res* 59:1236-1243, 1999; Bruggemann y Taussig *Curr Opin Biotechnol* 8:455-458, 1997; publicación de la patente internacional núm. WO2002/043478). Los loci de inmunoglobulina endógenos en estos ratones se pueden interrumpir o suprimir, y por lo menos un locus de inmunoglobulina

20 humana total o parcial puede insertarse en el genoma de ratón utilizando recombinación homóloga o no homóloga, utilizando transcromosomas, o utilizando minigenes. Empresas tales como Regeneron (http://_www_regeneron_com), Harbour Antibodies

(http://_www_harbourantibodies_com), Open Monoclonal Technology, Inc.

(OMT) (http://_www_omtinc_net), KyMab (http://_www_kymab_com), Trianni

(http://_www.trianni_com) y Ablexis (http://_www_ablexis_com) pueden

encargarse de proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno

5 seleccionado mediante el uso de tecnología como se describió anteriormente.

Los anticuerpos humanos pueden seleccionarse de una genoteca de presentación de fagos, en donde el fago se diseña para expresar

inmunoglobulinas humanas o porciones de estas tales como Fab, anticuerpos

de cadena sencilla (scFv), o regiones variables de anticuerpos no apareadas o

10 apareadas (Knappik *et al.*, *J Mol Biol* 296: 57-86., 2000; Krebs *et al.*, *J Immunol Meth* 254:67-84, 2001; Vaughan *et al.*, *Nature Biotechnology* 14:309-314, 1996;

Sheets *et al.*, *PITAS (USA)* 95:6157-6162, 1998; Hoogenboom and Winter, *J*

Mol Biol 227:381, 1991; Marks *et al.*, *J Mol Biol* 222:581, 1991). Los

anticuerpos de la invención pueden aislarse, por ejemplo, de genotecas de

15 presentación de fagos que expresan regiones variables de cadena ligera y

pesada de anticuerpos como proteínas de fusión con la proteína de cubierta pIX como se describe en Shi *et al.*, *J Mol Biol* 397:385-96, 2010 y en la

publicación de patente internacional núm. WO2009/085462). Las genotecas de

anticuerpos se examinan para detectar unión al dominio extracelular de CCL17

20 humana y los clones positivos obtenidos se caracterizan más aun, los Fabs se

aíslan de los lisatos de coles y se expresan como IgG en toda su extensión.

Esos métodos de exhibición de fagos para aislar anticuerpos humanos se

establecieron en la materia. Ver, por ejemplo: Las patentes de los EE. UU.

núm. 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 otorgadas a Ladner y otros; las patentes de los EE. UU. núm. 5.427.908 y 5.580.717 otorgadas a Dower y otros; las patentes de los EE. UU. núm. 5.969.108 y 6.172.197 otorgadas a McCafferty y otros; y las patentes de los EE. UU. núm. 5.885.793; 6.521.404; 5 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 concedida a Griffiths *et al.*

La preparación de antígenos inmunogénicos, y la producción de anticuerpo monoclonal se pueden ejecutar por medio del uso de cualquier técnica adecuada, tal como la producción de proteína recombinante. Los antígenos inmunogénicos se pueden administrar a un animal en la forma de 10 una proteína purificada, o mezclas de proteínas que incluyen células completas o extractos de célula o tejidos, o el antígeno se puede formar de nuevo en el cuerpo del animal a partir de ácidos nucleicos que codifican tal antígeno o una porción de este.

Los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción, 15 pueden ser humanos o humanizados.

Los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción pueden ser sintéticos o recombinantes.

Los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción pueden ser del tipo IgA, IgD, IgE, IgG o IgM. Los anticuerpos de la invención 20 descritos en la presente descripción pueden ser del isotipo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

Las propiedades efectoras de la inmunidad de los anticuerpos de la invención pueden mejorar o silenciarse mediante modificaciones del Fc por

técnicas conocidas por aquellos con experiencia en la materia. Por ejemplo, las funciones efectoras de Fc como la unión a C1q, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), citotoxicidad mediada por células y dependiente del anticuerpo (ADCC), fagocitosis, disminución de los receptores de la superficie celular (p. ej., receptor de células B; BCR), etc. modularse mediante la modificación de los residuos de Fc responsables de estas actividades. Las propiedades farmacocinéticas pueden mejorarse, además, al mutar residuos en el dominio Fc que extienden la vida media del anticuerpo. Las modificaciones de Fc ilustrativas son IgG4 S228P/L234A/L235A, IgG2 M252Y/S254T/T256E (Dall'Acqua *et al.* *J Biol Chem* 281:23514–24, 2006; o IgG2 V234A/G237A/P238S, V234A/G237A/H268Q, H268A/V309L/A330S/P331 o V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S en IgG2 (publicación de patente internacional núm. WO2011/066501), o las descritas en la patente de los EE. UU. núm. 6.737.056 (numeración de acuerdo con la numeración EU).

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, el anticuerpo que se une específicamente a CCL17 humana comprende una sustitución en una región de Fc.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la sustitución comprende sustitución de V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S o P331S en IgG2, o sustitución de S228P, L234A o L235A en IgG4, en donde la numeración de residuos es de acuerdo con el índice EU.

Además, los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción pueden modificarse postraduccion mediante procesos tales como glicosilación, isomerización, deglicosilación o modificación covalente de origen no natural, como la adición de porciones de polietilenglicol (pegilación) y lipidación. Tales modificaciones pueden producirse *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención se pueden conjugar con polietilenglicol (PEGilado) para mejorar sus perfiles farmacocinéticos. La conjugación puede realizarse mediante técnicas conocidas por aquellos con experiencia en la materia. Se ha demostrado que la conjugación de anticuerpos terapéuticos con PEG mejora la farmacodinámica sin interferir en la función (Knight *et al. Plateles* 15:409-418, 2004; Leong *et al., Cytokine* 16:106-119, 2001; Yang *et al., Protein Eng* 16:761-770, 2003).

Los anticuerpos o fragmentos de éstos de la invención descritos en la presente descripción que pueden modificarse para mejorar la estabilidad, selectividad, reactividad cruzada, afinidad, inmunogenicidad u otras propiedades biológicas o biofísicas deseables se encuentran dentro del alcance de la invención. La estabilidad de un anticuerpo está influenciada por una serie de factores que incluyen: (1) empaquetamiento nuclear de dominios individuales que afecta su estabilidad intrínseca, (2) interacciones interfaciales proteína/proteína que tienen impacto en el apareamiento de HC y LC, (3) entierro de residuos polares y cargados, (4) red de enlaces de H para residuos polares y cargados, y (5) distribución superficial de residuos cargados y polares entre otras fuerzas intra e intermoleculares (Worn and

Pluckthun, *J Mol Biol* 305:989-1010, 2001). Se puede identificar posibles residuos desestabilizadores de la estructura en base a la estructura cristalina del anticuerpo o por modelado molecular en ciertos casos, y se puede analizar el efecto de los residuos en la estabilidad del anticuerpo mediante la generación y evaluación de variantes que contienen mutaciones en los residuos identificados. Una de las formas para aumentar la estabilidad del anticuerpo es elevar el punto medio de transición térmica (T_m), medido por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Generalmente, la T_m de las proteínas se correlaciona con su estabilidad y se correlaciona de manera inversa con la susceptibilidad al despliegue y la desnaturalización en solución y los procesos de degradación que dependen de la tendencia de la proteína a desplegarse (Remmele *et al.*, *Pharm Res* 15:200-208, 1997). Varios estudios han encontrado una correlación entre la clasificación de la estabilidad física de las formulaciones medida como estabilidad térmica por DSC y la estabilidad física medida por otros métodos (Bedu-Addo *et al.*, *Pharm Res* 21:1353-1361, 2004; Gupta y Kaisheva, *AAPS PharSci*, 5E8, 2003; Maa y Hsu, *Int J Pharm* 140:155-168, 1996; Remmele *et al.*, *Pharm Res* 15:200-208, 1997; Zhang *et al.*, *J Pharm Sci* 93:3076-3089, 2004). Los estudios de formulación sugieren que la T_m de un Fab tiene implicaciones para la estabilidad física a largo plazo del mAc correspondiente. Las diferencias en los aminoácidos, ya sea en la región marco o en las CDR podrían tener efectos significativos sobre la estabilidad térmica del dominio Fab (Yasui *et al.*, *FEBS Lett* 353:143-146, 1994).

Los anticuerpos de CCL17 de la invención descritos en la presente descripción pueden integrarse en anticuerpos biespecíficos que además se encuentran dentro del alcance de la invención. Las regiones VL y/o VH de los anticuerpos de la invención pueden integrarse por medio del uso de

5 métodos publicados en anticuerpos biespecíficos de cadena simple como estructuras tales como diseños TandAb® (publicación de patente internacional núm. WO1999/57150; publicación de la patente de los EE. UU. núm. US2011/0206672) o en scFV biespecíficos como estructuras tales como las descritas en la patente de los Estados Unidos núm. 5.869.620;

10 publicación de la patente internacional No. WO1995/15388, publicación de la patente internacional núm. WO1997/14719 o publicación de patente internacional núm. WO2011/036460.

Las regiones VL y/o VH de los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción, pueden modificarse en anticuerpos biespecíficos de

15 longitud completa, donde cada brazo del anticuerpo se une a un antígeno o epítipo distinto. Típicamente, tales anticuerpos biespecíficos se hacen al modular las interacciones de CH3 entre las dos cadenas pesadas de los anticuerpos para formar anticuerpos biespecíficos por medio del uso de tecnologías tales como las descritas en la patente de los Estados Unidos núm.

20 US7695936; publicación de la patente internacional núm. WO2004/111233; la publicación de la patente de los EE. UU. núm. US2010/0015133; la publicación de la patente de los EE. UU. núm. US2007/0287170; publicación de la patente internacional núm. WO2008/119353; la publicación de la patente de los EE. UU.

núm. US2009/0182127; la publicación de la patente de los EE. UU. núm.

US2010/0286374; la publicación de la patente de los EE. UU. núm.

US2011/0123532; publicación de la patente internacional núm. WO2011/131746;

publicación de la patente internacional núm. WO2011/143545; o publicación de

5 la patente de EE. UU. núm. US2012/0149876. Estructuras biespecíficas

adicionales en las que se pueden incorporar las regiones VL y/o VH de los

anticuerpos de la invención son por ejemplo Inmunoglobulinas de Dominio

Variable Dual (publicación de patente internacional núm. WO2009/134776), o

estructuras que incluyen varios dominios de dimerización para conectar los dos

10 brazos del anticuerpo con diferentes especificidades, tales como cremallera de

leucina o dominios de dimerización de colágeno (publicación de patente núm.

WO2012/022811, patente de los EE. UU. núm. 5.932.448; patente de los EE.

UU. núm. 6.833.441).

Otra modalidad de la invención es un polinucleótido aislado que

15 codifica cualquiera de las regiones variables de cadena pesada del anticuerpo

o las regiones variables de cadena ligera del anticuerpo de la invención.

Ciertos polinucleótidos ilustrativos se describen en la presente descripción,

sin embargo, otros polinucleótidos que, dado la degeneración del código

genético o las preferencias de codón en un sistema de expresión dado,

20 codifican los anticuerpos de la invención están, además, dentro del alcance

de la invención. Las secuencias de polinucleótidos que codifican una VH o

una VL o un fragmento de estas del anticuerpo de la invención pueden unirse

operativamente a uno o más elementos reguladores, tales como un promotor

y potenciador, que permiten la expresión de la secuencia de nucleótidos en la célula huésped pretendida. El polinucleótido puede ser un ADNc.

Otra modalidad de la invención es un vector que comprende el polinucleótido de la invención. Tales vectores pueden ser vectores

5 plasmídicos, vectores virales, vectores para la expresión de baculovirus, vectores basados en transposones o cualquier otro vector adecuado para introducir el polinucleótido de la invención en un organismo o fondo genético dado por cualquier medio. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos de la

10 invención, opcionalmente ligados a regiones constantes, se insertan en vectores de expresión. Las cadenas ligeras y pesadas se pueden clonar en los mismos o diferentes vectores de expresión. Los segmentos de ADN que codifican cadenas de inmunoglobulina se unen operablemente a las secuencias control en el(los) vector(es) de expresión que aseguran la

15 expresión de los polipéptidos de inmunoglobulina. Tales secuencias control incluyen secuencias señal, promotores (p. ej., promotores naturalmente asociados o heterólogos), elementos potenciadores, y secuencias de terminación de la transcripción, y se seleccionan para que sean compatibles con la célula huésped elegida para expresar el anticuerpo. Una vez que el

20 vector se incorpora en el huésped adecuado, el huésped se mantiene bajo condiciones adecuadas para altos niveles de expresión de las proteínas codificadas por los polinucleótidos incorporados.

Los vectores de expresión adecuados son, típicamente, replicables en los organismos huéspedes ya sea como episomas o como parte integral del ADN cromosomal del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección tales como resistencia a la ampicilina, resistencia a la higromicina, resistencia a la tetraciclina, resistencia a la canamicina o resistencia a la neomicina para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

Los elementos promotores y potenciadores adecuados se conocen en la materia. Para la expresión en una célula bacteriana, los promotores ilustrativos incluyen *lacI*, *lacZ*, T3, T7, *gpt*, *lambda P* y *trc*. Para la expresión en una célula eucariota, los promotores ilustrativos incluyen promotores del gen de inmunoglobulina de cadena ligera y/o pesada, y elementos potenciadores; promotor inmediato temprano del citomegalovirus; promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple; promotores SV40 temprano y tardío; promotor presente en las repeticiones terminales largas de un retrovirus; promotor de metalotioneína-I de ratón; y varios promotores específicos de tejido conocidos en la materia. Para la expresión en una célula de levadura, un promotor ilustrativo es un promotor constitutivo tal como un promotor *ADH1*, un promotor *PGK1*, un promotor *ENO*, un promotor *PYK1* y similares; o un promotor regulable tal como un promotor *GAL1*, un promotor *GAL10*, un promotor *ADH2*, un promotor *PH05*, un promotor *CUP1*, un promotor *GAL7*, un promotor *MET25*, un promotor *MET3*, un promotor *CYC1*, un promotor *HIS3*, un promotor *ADH1*, un promotor *PGK*, un promotor *GAPDH*, un promotor *ADC1*,

un promotor TRP1, un promotor URA3, un promotor LEU2, un promotor ENO, un promotor TP1 y AOX1 (p. ej., para usar en Pichia). La selección del vector y promotor adecuado está dentro del nivel de experiencia ordinaria en la materia.

Los expertos en la materia conocen un gran número de vectores y
 5 promotores adecuados; muchos están disponibles comercialmente para generar construcciones recombinantes de un sujeto. Como ejemplo, se proporcionan los siguientes vectores. Bacterianos: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, y pRIT5
 10 (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Eucariotas: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL (Pharmacia).

Otra modalidad de la invención es una célula huésped que comprende el vector de la invención. El término “célula huésped” se refiere a la célula dentro de la que se introduce un vector. Se entiende que el término célula
 15 huésped se pretende que se refiera no solamente a la célula sujeto particular sino a la progenie de tal célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en las generaciones venideras, ya sea debido a una mutación o influencias del medio ambiente, la progenie puede no ser idéntica a la célula original, pero todavía se incluyen en el alcance del término “célula huésped”,
 20 como se usa en la presente descripción. Tales células huéspedes pueden ser células eucariotas, células procariotas, células de plantas o células de arquea.

Escherichia coli, bacilli, tal como Bacillus subtilis, y otras enterobacterias, tal como Salmonella, Serratia, y varias especies de

Pseudomonas son ejemplos de células huésped procariotas. Otros microbios, tales como levadura, son útiles, además, para la expresión. Saccharomyces (p. ej., *S. cerevisiae*) y *Pichia* son ejemplos de células huésped de levaduras adecuadas. Las células eucariotas ilustrativas pueden ser de mamífero,

5 insecto, aves o de otros orígenes animales. Las células eucariotas de mamífero incluyen líneas celulares inmortalizadas tales como hibridomas o líneas celulares de mieloma tales como SP2/0 (American Type Culture Collection) (ATCC), Manassas, VA, CRL-1581), NS0 (European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK, ECACC Núm. 85110503),
10 FO (ATCC CRL-1646) y la línea celular murina Ag653 (ATCC CRL-1580).

Una línea celular ilustrativa de mieloma humano es U266 (ATCC CRL-TIB-196). Otras líneas celulares útiles incluyen las derivadas de células de ovario de hámster chino (CHO), tales como CHO-K1SV (Lonza Biologics, Walkersville, MD), CHO-K1 (ATCC CRL-61) o DG44.

15 Otra modalidad de la invención es un método para producir un anticuerpo de la invención que comprende cultivar la célula huésped de la invención y la recuperación del anticuerpo producido por la célula huésped. Los métodos para fabricar y purificar los anticuerpos son muy conocidos en la materia. Una vez sintetizada (ya sea químicamente o mediante
20 recombinación), los anticuerpos completos, sus dímeros, cadenas ligeras y pesadas individuales, u otros fragmentos de anticuerpos, tales como VH o VL, se pueden purificar de acuerdo con procedimientos estándares de la técnica, que incluyen precipitación con sulfato de amonio, columnas de

afinidad, cromatografía en columna, purificación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), electroforesis en gel, y lo similar (ver, generalmente, Scopes, Protein Purification (Springer- Verlag, N. Y., (1982)) Un anticuerpo de un sujeto puede ser sustancialmente puro, por ejemplo, al menos

5 aproximadamente 80 % a 85 % puro, al menos aproximadamente 85 % a 90 % puro, al menos aproximadamente 90 % a 95 % puro, o al menos aproximadamente 98 % a 99 %, o más, puro, por ejemplo, libre de contaminantes tales como restos de células, macromoléculas que no sean un anticuerpo de un sujeto, etc.

10 Los polinucleótidos que codifican ciertas secuencias de VH O VL de la invención se incorporan en vectores mediante el uso de métodos de biología molecular estándar. La transformación, el cultivo, la expresión de anticuerpos y la purificación de células huésped se realizan mediante el uso de métodos conocidos.

15

Métodos de tratamiento

Los anticuerpos que se une específicamente a CCL17 humana pueden ser adecuados para tratar o prevenir un espectro de condiciones mediadas por CCL17.

20 Como se usa en la presente descripción, el término “enfermedad mediada por CCL17” abarca todas las enfermedades y afecciones médicas en las que CCL17 juega un papel, ya sea directa o indirectamente, en la

enfermedad o afección médica, que incluyen la etiología, el desarrollo, progreso, persistencia o patología de la enfermedad o afección.

Como se usa en la presente descripción, el término “enfermedad inflamatoria mediada por CCL17” se refiere a una enfermedad inflamatoria que resulta, al menos parcialmente, de la actividad biológica de CCL17.

Enfermedades inflamatorias ilustrativas mediadas por CCL17 son el asma y las alergias.

Los métodos de la invención pueden usarse para tratar un paciente animal perteneciente a cualquier clasificación. Los ejemplos de esos animales incluyen mamíferos tales como humanos, roedores, perros, gatos y animales de granja. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención son útiles en la profilaxis y en el tratamiento de condiciones mediadas por CCL17, tales como asma y enfermedades alérgicas de las vías respiratorias, tales como asma alérgica, rinitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis pulmonar idiopática (IPF, por sus siglas en inglés), enfermedades pulmonares de hipersensibilidad y lo similar, enfermedades alérgicas, tales como anafilaxis sistémicas o respuestas a la hipersensibilidad, alergias a fármacos, aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), alergias a las picaduras de insectos y alergias a ciertos alimentos, enfermedades inflamatorias del intestino, tales como enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, ileítis y enteritis, vaginitis, psoriasis y dermatosis inflamatorias tales como eczema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto alérgica, urticaria y prurito, vasculitis, spondiloartropatías, esclerodermia, enfermedades autoinmunes,

tales como artritis (incluyendo artritis soriásica y reumatoidea), esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, diabetes tipo I, glomerulonefritis, y lo similar, rechazos de injertos (incluyendo rechazos de aloinjerto y enfermedad de injertos-contra-huésped), y otras enfermedades en donde debe evitarse

5 las respuestas inflamatorias no deseadas, tales como arteroesclerosis, miositis, enfermedades degenerativas mediadas por células T, esclerosis múltiple, encefalitis, meningitis, hepatitis, nefritis, sepsis, sarcoidosis, conjuntivitis alérgica, otitis, enfermedad de Castleman, sinusitis, choque endotóxico inducido por LPS, síndrome de Behcet y gota.

10 Los anticuerpos de la invención descritos en la presente descripción son útiles, además, en la preparación de un medicamento para dicho tratamiento, en donde el medicamento se prepara para la administración en dosificaciones definidas en la presente descripción.

Los métodos y usos de la presente pueden estar destinados a su uso
15 en animales y pacientes que tienen, o están en riesgo de desarrollar, cualquier enfermedad o condición relacionada con la expresión o actividad biológica de CCL17 o en el cual la CCL17 desempeña una función biológica.

Sin pretender limitarse a ninguna teoría, los anticuerpos de la invención pueden proporcionar su efecto beneficioso en varias enfermedades inflamatorias
20 mediante la inhibición directa del reclutamiento de células Th2 y, por lo tanto, la inhibición simultánea de múltiples citocinas de Th2. Los anticuerpos de la invención pueden proporcionar un mejor perfil de seguridad en comparación con los anticuerpos anti-CCR4 al bloquear selectivamente solo la CCL17. Los

anticuerpos no interactuarán con plaquetas, que expresen CCR4. Además, los anticuerpos no bloquearán los efectos inmunes innatos beneficiosos de CCL22 sobre CCR4 (Matsukawa *et al.*, *J. Immunol* 164:5382-8, 2000).

Como se usa en la presente descripción, “enfermedad inflamatoria” se
 5 refiere las respuestas agudas o crónicas localizadas o sistémicas a estímulos nocivos, tales como patógenos, células dañadas, lesión corporal o irritantes, que están mediados en parte por la actividad de citocinas, quimocinas o células inflamatorias (p. ej., neutrófilos, monocitos, linfocitos, macrófagos, mastocitos, células dendríticas, neutrófilos) y está caracterizada la mayoría de las veces
 10 por dolor, enrojecimiento, hinchazón y disfunción de los tejidos.

La afección inflamatoria pulmonar es un ejemplo de una afección inflamatoria mediada por CCL17. Las afecciones pulmonares inflamatorias ilustrativas incluyen afecciones pulmonares inducidas por infecciones, que incluyen las asociadas con infecciones virales, bacterianas, micóticas,
 15 parasitarias o por priones; afecciones pulmonares inducidas por alérgenos; afecciones pulmonares inducidas por contaminantes, tales como asbestosis, silicosis o beriliosis; afecciones pulmonares inducidas por aspiración gástrica, desregulación inmune, afecciones inflamatorias con predisposición genética, tales como fibrosis quística, y afecciones físicas pulmonares inducidas por
 20 traumatismo, tales como las lesiones por ventilador. Estas afecciones inflamatorias incluyen, además, asma, enfisema, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), sarcoidosis, histiocitosis, linfangiomatosis, lesión aguda del pulmón, síndrome de aflicción

respiratoria aguda, enfermedad crónica de los pulmones, displasia broncopulmonar, neumonía comunitaria adquirida, neumonía nosocomial, neumonía asociada al ventilador, sepsis, neumonía viral, infección por influenza, infección por parainfluenza, infección por rotavirus, infección por metapneumovirus humano, infección por el virus sincicial respiratorio y *Aspergillus* u otras infecciones fúngicas. Las enfermedades inflamatorias ilustrativas asociadas a infecciones pueden incluir neumonía viral o bacteriana, como neumonía grave, fibrosis quística, bronquitis, exacerbaciones de las vías respiratorias y síndrome de insuficiencia respiratoria aguda (ARDS). Esas afecciones asociadas con infecciones pueden involucrar infecciones múltiples tales como una infección viral primaria y una infección bacteriana secundaria.

El asma es una enfermedad inflamatoria de los pulmones que se caracteriza por hiperreactividad de las vías respiratorias (“AHR”), broncoconstricción, sibilancias, inflamación eosinofílica o neutrofílica, hipersecreción de moco, fibrosis subepitelial y niveles elevados de IgE. Los pacientes con asma experimentan “exacerbaciones”, un empeoramiento de los síntomas, debido, comúnmente, a infecciones microbianas del tracto respiratorio (*p. ej.*, rinovirus, virus de la influenza, *Haemophilus influenzae*, etc.). Los ataques asmáticos pueden estar provocados por factores ambientales (*p. ej.*, áscaris, insectos, animales (*p. ej.*, gatos, perros, conejos, ratones, ratas, hámsteres, cobayos y aves), hongos, contaminantes del aire (*p. ej.*, humo del tabaco), gases irritantes, humos, vapores, aerosoles, sustancias químicas, polen, ejercicio o aire frío. Además del asma, varias

enfermedades inflamatorias crónicas que afectan el pulmón se caracterizan por la infiltración de neutrófilos en las vías respiratorias, por ejemplo, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), neumonía bacteriana y fibrosis quística (Linden *et al. Eur Respir J* 15:973-7, 2000; Rahman *et al. Clin Immunol* 115:268-76, 2005), y enfermedades tales como COPD, rinitis alérgica, y fibrosis quística se caracterizan por hiperreactividad de las vías respiratorias (Fahy y O'Byrne, *Am J Respir Crit Care Med* 163:822-3, 2001).

En el asma alérgico, la presencia de altos niveles de IgE específico de alérgeno es un reflejo de una respuesta inmune a células Th2 aberrantes para alérgenos ambientales inhalados comúnmente. Los alérgenos son presentados a las células T por células dendríticas (DC, por sus siglas en inglés) que sacan muestras continuamente de los antígenos extraños entrantes. Después de la activación adecuada por parte de los DC, los linfocitos específicos de alérgenos que se encuentran presentes en las vías respiratorias enfermas producen interleucinas de citocinas de Th2(IL)-4, IL-5 e IL-13 que, además, controlan la extravasación leucocitaria, hiperplasia de células caliciformes e hiperreactividad bronquial (BHR, por sus siglas en inglés). Las CCL17 producidas por DC inducen la migración selectiva de células Th2, pero no de las células Th1 mediante el accionamiento de CCR4.

En modelos de asma en murinos, este tratamiento con anticuerpos anti-CCL17 redujo la cantidad de células T CD4+ y eosinófilos en el fluido de lavado broncoalveolar (BAL, por sus siglas en inglés), la producción de citocinas de Th2, e hiperreactividad de las vías respiratorias después de

desafío de alérgeno, lo que sugiere que la neutralización de CCL17 es una estrategia factible para inhibir la inflamación alérgica en los seres humanos.

Los modelos animales usados comúnmente para el asma y la inflamación de las vías respiratorias incluyen el modelo del reto con ovalbúmina, modelos de sensibilización a la metacolina y sensibilización con *Aspergillus fumigatus* (Hessel *et al.*, *Eur J Pharmacol* 293:401-12, 1995). La inhibición de la producción de citocinas y quimocina a partir de células humanas cultivadas, tales como células bronquiales epiteliales, fibroblastos bronquiales o células de músculo liso de las vías respiratorias se puede usar, además, como modelo *in vitro*. La administración de anticuerpos de la presente invención a cualquiera de estos modelos puede usarse para evaluar su eficacia para mejorar síntomas y alterar el curso del asma, la inflamación de las vías respiratorias, EPOC, y similares.

La dermatitis atópica es un ejemplo de una afección inflamatoria mediada por CCL17.

Un aspecto de la invención es un método para tratar una enfermedad mediada por CCL17, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite el anticuerpo de la invención durante un tiempo suficiente para tratar la enfermedad mediada por CCL17.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la enfermedad mediada por CCL17 es una enfermedad inflamatoria.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la enfermedad inflamatoria es asma, colitis ulcerativa (UC, por sus siglas en

inglés), dermatitis atópica (AD, por sus siglas en inglés) o fibrosis pulmonar idiopática (IPF, por sus siglas en inglés).

Una modalidad de la invención es un método para tratar el asma; el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite un anticuerpo de la invención durante un tiempo suficiente para tratar el asma.

Una modalidad de la invención es un método para tratar la colitis ulcerativa; el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite un anticuerpo de la invención durante un tiempo suficiente para tratar la colitis ulcerativa.

Una modalidad de la invención es un método para tratar la dermatitis atópica; el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite un anticuerpo de la invención durante un tiempo suficiente para tratar la dermatitis atópica.

Una modalidad de la invención es un método para tratar la fibrosis pulmonar idiopática; el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite un anticuerpo de la invención durante un tiempo suficiente para tratar la fibrosis pulmonar idiopática.

Composiciones farmacéuticas/administración

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos que se unen específicamente a CCL17 de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Para uso terapéutico, los anticuerpos que se unen específicamente a CCL17 de la invención se

pueden preparar como composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad eficaz del dominio, la molécula o el anticuerpo como un ingrediente activo en un portador farmacéuticamente aceptable. El término “portador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se

5 administra el compuesto activo. Los vehículos podrían ser líquidos, tales como agua y aceites, que incluyen los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, y lo similar. Por ejemplo, puede usarse solución salina al 0,4 % y glicina al 0,3 %. Estas soluciones son estériles y, generalmente,

10 libres de materia particulada. Pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas (p. ej., filtración). Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, según se requiera, para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes ajustadores y reguladores del pH, agentes

15 estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes, etc. La concentración de las moléculas o del anticuerpo de la invención descrita en la presente descripción en tal formulación farmacéutica puede variar ampliamente, es *decir*, de menos de aproximadamente 0,5 %, usualmente, a o por lo menos aproximadamente 1 % hasta tanto como 15 o 20 % en peso y se selecciona

20 principalmente según la dosis requerida, los volúmenes de fluido, las viscosidades, etc., de conformidad con el modo particular de administración seleccionado. Las formulaciones y vehículos adecuados, inclusive otras proteínas humanas, por ejemplo, la albúmina de suero humano, se

describen, por ejemplo, en por ejemplo Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21.º edición, Troy, D. B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Parte 5, Pharmaceutical Manufacturing págs. 691-1092. Veá, especialmente, las págs. 958-989.

5 El modo de administración para uso terapéutico de los anticuerpos que se unen específicamente a CCL17 de la invención descrita en la presente descripción puede ser cualquier ruta que suministre el agente al huésped, tal como administración parenteral, por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o subcutánea, pulmonar; transmucosa (oral, 10 intranasal, intravaginal, rectal); mediante el uso de una formulación en una tableta, cápsula, solución, polvo, gel, partícula; y contenida en una jeringa, un dispositivo implantado, bomba osmótica, cartucho, microbomba; u otros medios apreciados por la persona con experiencia y conocidos en la materia. La administración a un sitio específico puede lograrse, por ejemplo, por 15 suministro intra-articular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavidad, intraceliaca, intracelebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intracardiaco, intraosteal, intrapélvico, intrapericardiaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intraretinal, 20 intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravascular, intravesical, intralesional, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmico.

Por lo tanto, una composición farmacéutica de la invención descrita en la presente descripción para inyección intramuscular puede prepararse para

contener 1 ml de agua regulada estéril, y entre aproximadamente 1 ng y aproximadamente 100 mg/kg, *por ejemplo*, de aproximadamente 50 ng a aproximadamente 30 mg/kg o, con mayor preferencia, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25 mg/kg de los anticuerpos que se unen

5 específicamente a CCL17 de la invención.

La dosis administrada a un paciente que tiene una afección mediada por CCL17 es suficiente para aliviar los síntomas o para tratar la condición mediada por CCL17 (“cantidad terapéuticamente efectiva”) y es, algunas veces, de 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
10 o 10 mg/kg, pero, aun puede ser mayor, por ejemplo, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg. Además, puede administrarse una dosis unitaria fija, por ejemplo, 50, 100, 200, 500 o 1000 mg o la dosis puede basarse en el área de superficie del paciente, por ejemplo, 400, 300, 250, 200 o 10 mg/m².

Usualmente, se administran entre 1 y 8 dosis (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8), pero
15 podrían suministrarse 10, 12, 20 o más dosis. La administración de los anticuerpos que se unen específicamente a CCL17 de la invención descrita en la presente descripción podría repetirse después de un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, una semana, dos semanas, tres semanas, seis semanas, siete semanas, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco
20 meses, seis meses o más. Además, los cursos de tratamiento repetidos son posibles, como lo es la administración crónica. La administración repetida puede realizarse a la misma dosis o a una dosis diferente.

La dosificación de los anticuerpos de CCL17 de la invención descrita en la presente descripción que serán efectivos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias tal como asma se puede determinar al administrar los anticuerpos de CCL17 a modelos animales relevantes bien conocidos en la materia y como se describe en la presente descripción.

Los ensayos *in vitro* se pueden emplear, opcionalmente, para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptima. Los expertos en la materia pueden determinar la selección de una dosis efectiva particular (*p. ej.*, a través de ensayos clínicos) en base a la consideración de varios factores. Tales factores incluyen la enfermedad a tratar o prevenir, los síntomas involucrados, la masa corporal del paciente, el estado inmunitario del paciente y otros factores conocidos por el experto. La dosis precisa a emplear en la formulación depende, además, de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas pueden extrapolarse de curvas de respuesta a la dosis derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o en modelos animales. Los anticuerpos de la invención se pueden probar para su eficacia y dosificación efectiva con el uso de cualquiera de los modelos descritos en la presente descripción.

Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende los anticuerpos que se unen específicamente a CCL17 de la invención descrita en la presente descripción para infusión intravenosa pueden estar compuestas de aproximadamente 200 ml de solución estéril de Ringer y

aproximadamente 8 mg a aproximadamente 2400 mg, aproximadamente 400 mg a aproximadamente 1600 mg, o aproximadamente 400 a aproximadamente 800 mg de los anticuerpos que se unen específicamente a CCL17 de la invención para administrar a un paciente de 80 kg. Los métodos
5 para preparar composiciones que pueden administrarse por vía parenteral son conocidos y se describen con más detalle, por ejemplo, en “Remington's Pharmaceutical Science”, 15.º ed., Mack Publishing Company, Easton, PA.

Los anticuerpos que se unen específicamente a CCL17 de la invención descrita en la presente descripción pueden liofilizarse para el almacenamiento y
10 reconstituirse en un portador adecuado antes del uso. Esta técnica ha demostrado su eficacia con preparaciones de proteínas convencionales y puede usarse técnicas de liofilización y reconstitución muy conocidas en la materia.

Los anticuerpos que se unen específicamente a CCL17 de la invención descrita en la presente descripción puede administrarse en conjunto con un
15 segundo agente terapéutico simultáneo, secuencial o separadamente.

La presente invención se describirá con referencia a los siguientes ejemplos específicos, no limitantes.

Ejemplo 1. Generación de anticuerpos neutralizantes de CCL17

20 Los Fab que se unen a CCL17 humana se seleccionaron de nuevo de genotecas de presentación de fago pIX descritas en Shi *et al.*, J. Mol. Biol. 397:385-396, 2010; publicación de la patente internacional núm. WO2009/085462; la publicación de la patente de los EE. UU. núm.

US2010/0021477; la publicación de la patente de los EE. UU. núm.

US2012/0108795. En resumen, las genotecas se generaron mediante la diversificación de supercóntigos humanos donde los genes VH de la línea germinal IGHV1-69*01, IGHV3-23*01, e IGHV5-51*01 se recombinan con el

5 minigen IGJ-4 humano vía el bucle H3, y los genes VL kappa de la línea germinal humana O12 (IGKV1-39*01), L6 (IGKV3-11*01), A27 (IGKV3-20*01), y B3 (IGKV4-1*01) se recombinan con el minigen IGKJ-1 para ensamblar dominios VH y VL completos. Se seleccionaron las posiciones en las regiones variables de cadena pesada y ligera en torno a los bucles H1,

10 H2, L1, L2 y L3 que se corresponden con las posiciones que se identifica están frecuentemente en contacto con los antígenos de las proteínas y péptidos para su diversificación. La diversidad de secuencia en las

posiciones seleccionadas se limitó a los residuos que ocupan cada posición en las familias de genes de las líneas germinales IGHV o IGLV de los genes

15 IGHV o IGLV respectivos. La diversidad en el bucle H3 se generó mediante la utilización de bucles sintéticos de tamaño corto a medio de longitudes de 7-14 aminoácidos. La distribución de aminoácidos en H3 se diseñó para simular la variación observada de aminoácidos en los anticuerpos humanos. Se detalla el diseño de genotecas en Shi *et al.* J Mol Biol 397:385-96, 2010.

20 Los supercóntigos utilizados para generar las genotecas se denominaron de acuerdo con el origen de los genes de las líneas germinales VH y VL humanas. Las tres genotecas de cadena pesada se combinaron con las cuatro cadenas ligeras de la línea germinal o con las genotecas de cadena

ligera de la línea germinal para generar 24 combinaciones VH:VL únicas para su evaluación. Se utilizaron las 24 combinaciones de las genotecas VH:VL en los experimentos de selección de fagos contra CCL17 humana.

Las genotecas se depuraron por medio del uso de CCL17 humana de
5 identificación de secuencia núm.: 1. Brevemente, la CCL17 humana se biotiniló por medio del uso de métodos estándar y la CCL17 humana biotinilada (Bt-huCCL17) se capturó en bolitas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Dyna, M280), y las genotecas de fagos Fab-pIX se adicionaron a las bolitas. Las concentraciones de Bt-huCCL17 usadas fueron 100 nM para las rondas 1
10 y 2, y 10 mM para las rondas 3 y 4). La evaluación se realizó mediante ELISA para Fab que se une a la proteína CCL17 humana. Para la selección, las bolitas magnéticas recubiertas de bt-huCCL17 se lavaron y se bloquearon con PBST-M (BPS con 0,05 % de Tween-20 y 3 % de leche en polvo sin grasa). Se adicionaron fagos bloqueados a las bolitas y se giraron a temperatura ambiente
15 durante la ronda 1. Las bolitas se lavaron y, después, se incubaron en un cultivo de células de E. coli en fase logarítmica (MC1061F') y la E coli infectada se cultivaron en placas de agar LB durante la noche a 37 °C. La mañana siguiente, los cultivos se rasparon de las placas en 2 mL 2xYT (20 % de glicerol) por placa, se adicionó 50 µL de suspensión bacteriana a 50 mL 2xYT
20 (Carb) y se cultivó a 37 °C agitando por hasta 2 horas. El fago auxiliar se adicionó a cultivos en fase logarítmica media y los cultivos se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Se adicionaron canamicina y IPTG a cada cultivo a concentraciones finales de 35 µg/ml y 1 mM, respectivamente, y se cultivaron

durante la noche a 30 °C agitando. El fago amplificado de los medios bacterianos se precipitó mediante el uso de PEG/NaCl y se volvió a suspender en 1 ml de PBS. Se usó 200 µL para la próxima ronda de selección.

Después de las tres rondas de selección, el ADN de fagomidio se aisló de las células MC1061F' infectadas y se digirió con enzimas de restricción para remover la secuencia que codifica pIX, y el ADN plasmídico linearizado se escindió y purificó de los geles de agarosa. Este ADN, después, se autoligó con ADN ligasa T4. El ADN ligado se electroporó en células MC1061F' y se sembraron en placas sobre placas de agar de LB (Carb/Glucosa). Las colonias de esta electroporación se seleccionaron para análisis de ELISA y se evaluaron en cuanto a expresión de Fab. Los fab contienen una etiqueta His dentro del marco en el extremo c-terminal de la cadena pesada. Del análisis inicial, 24 Fab se purificaron parcialmente mediante la etiqueta His C-terminal mediante el uso de métodos estándar y se caracterizaron más aún.

Los Fab se caracterizaron por su unión a CCL17 humana (identificación de secuencia núm.: 1), CCL17 de cyno (identificación de secuencia núm.: 2) y CCL22 de cyno (identificación de secuencia núm.: 3) en un ensayo ELISA. Brevemente, placas Maxisorp de 96 pocillos se recubrieron con 1 µg/ml de kappa antihumana de cabra (Southern Biotech). Se adicionó Fab semipurificado a cada placa. Se adicionó huCCL17, cCCL17 o cCCL22 biotinilado a cada pocillo capturado con Fab. Las proteínas unidas a los Fab capturados se detectaron mediante el uso de Estreptavidina:HRP. Cinco Fab

(f21, f24, F34, F43 y F44) que se unen a ambas CCL17 humana y de cyno pero no a CCL22 de cyno se seleccionaron para la maduración por afinidad.

Ejemplo 2. Maduración por afinidad de anticuerpos anti-CCL17

Se seleccionaron cinco Fab para maduración por afinidad sobre la base de su perfil de caracterización inicial. Los Fab se maduraron por afinidad al diversificar las cadenas ligeras mediante el uso de tecnología de maduración en línea descrita en Shi et al. (Shi *et al.*, *J Mol Biol* 397:385-396, 2010) y al mantener la cadena pesada sin variante. La cadena pesada en los Fab fue VH3-23 o VH5-51. Las genotecas de maduración por afinidad producidas F24 mejoraron las ligaduras de CCL17.

Brevemente, se maduró por afinidad F24 mediante el uso de genoteca de cadena ligera de B3. El esquema de diversificación de la genoteca de B3 se muestra en la Tabla 2. Las posiciones se indican como numeración de Kabat.

Tabla 2.

Posición del residuo (Kabat)	Residuo de la línea germinal	Composiciones de la genoteca
27d	Y	SYHFA
30	K	KTNE
32	Y	YFHNWDAS
50	W	YWSRDYA
91	Y	YSHA
92	Y	YNDSHIFK
93	S	SNTDGHR
94	T	TYLVFAS
96	L	WYFLIR

Las regiones VH de los Fab se clonaron en el fagómido de la genoteca de LC lo que resulta en una rediversificación completa de la LC para cada Fab. Las regiones de VH se aislaron por digestión por restricción de minipreparados de ADN mediante el uso de NcoI y ApaI. Las regiones de

5 VH se aislaron en gel y se ligaron en ADN de genoteca de LC digerido similarmente. Las ligaduras se purificaron y se transformaron en células MC1061F'. Las células se cultivaron en 2xYT (Carb) hasta que se alcanzó la fase de crecimiento logarítmica ($OD_{600\text{ nm}} \approx 0,6$). Se adicionó el fago auxiliar y los cultivos se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Se adicionaron

10 Kanamicina y IPTG a cada cultivo a concentraciones finales de 35 ug/ml y 1 mM, respectivamente, y se cultivaron durante la noche a 30 °C agitando. El fago del medio bacteriano se precipitó mediante el uso de PEG/NaCl y se volvió a suspender en PBS.

Para selección por maduración por afinidad, se capturó Bt-CCL17 en

15 50 µl de bolitas magnéticas recubiertas con SA. Las concentraciones de antígeno fueron 100 nM para la ronda 1, 10 nM para la ronda 2 y 10 nM para la ronda 3. Las bolitas se sometieron a 6 lavados con PBST y un lavado con PBS, seguido por infección con E. coli como se describió anteriormente. El aislamiento de plásmidos de expresión de Fab y la expresión de Fab se

20 realizó como se describe.

Los Fab madurados por afinidad se analizaron en un ensayo de ELISA para la unión a huCCL17 (identificación de secuencia núm.: 1), cCCL17 (identificación de secuencia núm.: 2) y cCCL22 (identificación de secuencia

núm.: 3) como se describió anteriormente para la unión a huCCL17. Los clones identificados se secuenciaron, se convirtieron en anticuerpos de IgG1 completos y su unión a huCCL17, cCCL17 y cCCL22 se confirmó utilizando MSD-SEA.

Las secuencias de CDR de los anticuerpos originales y madurados por afinidad se muestran en la Tabla 3 y la Tabla 4 para CDR de cadena pesada y de cadena ligera, respectivamente.

Tabla 3.

	Ident. de mAb	HDCR1		HCDR2		HCDR3	
		Secuencia	identificación de secuencia núm.:	Secuencia	identificación de secuencia núm.:	Secuencia	identificación de secuencia núm.:
10	C17F24 (original)	SYWIG	4	IIDPSDSDT RYSPSFQG	5	VGPADVW DSFDY	6
	C17B234	SYWIG	4	IIDPSDSDT RYSPSFQG	5	VGPADVW DSFDY	6
	C17B235	SYWIG	4	IIDPSDSDT RYSPSFQG	5	VGPADVW DSFDY	6
	C17B236	SYWIG	4	IIDPSDSDT RYSPSFQG	5	VGPADVW DSFDY	6
15	C17B237	SYWIG	4	IIDPSDSDT RYSPSFQG	5	VGPADVW DSFDY	6
	C17B238	SYWIG	4	IIDPSDSDT RYSPSFQG	5	VGPADVW DSFDY	6
	C17B239	SYWIG	4	IIDPSDSDT RYSPSFQG	5	VGPADVW DSFDY	6
	C17B240	SYWIG	4	IIDPSDSDT RYSPSFQG	5	VGPADVW DSFDY	6
20	C17B241	SYWIG	4	IIDPSDSDT RYSPSFQG	5	VGPADVW DSFDY	6
	C17B242	SYWIG	4	IIDPSDSDT RYSPSFQG	5	VGPADVW DSFDY	6
	C17B243	SYWIG	4	IIDPSDSDT RYSPSFQG	5	VGPADVW DSFDY	6
	C17B244	SYWIG	4	IIDPSDSDT RYSPSFQG	5	VGPADVW DSFDY	6

Tabla 4.

	Ident. de mAb	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		Secuencia	identificación de secuencia núm.:	Secuencia	identificación de secuencia núm.:	Secuencia	identificación de secuencia núm.:
5	C17F24 (original)	KSSQSVLYS SNNKNYLA	7	WASTRES	19	QQYYSTPLT	27
	C17B234	KSSQSVLLS FDNINKLA	8	NASTRES	20	QQFYSPVST	28
	C17B235	KSSQSVLYS FYNFNALA	9	HASTRES	21	QQFYATPFT	29
	C17B236	KSSQSVLLS PWNSNQLA	10	GASTRES	22	QQYYLIPST	30
	C17B237	KSSQSVLTS YNNSNYLA	11	LASTRES	23	QQYLSPPST	31
10	C17B238	KSSQSVLIS AFNQNPALA	12	DASTRES	24	QQYQFIPFT	32
	C17B239	KSSQSVLSS FTNTNTLA	13	HASTRES	21	QQYLIYPST	33
	C17B240	KSSQSVLYS HVNYNALA	14	NASTRES	20	QQYYTLPAT	34
	C17B241	KSSQSVLNS FTNNNALA	15	EASTRES	25	QQTNSIPLT	35
	C17B242	KSSQSVLFS HDNLNTLA	16	HASTRES	21	QQYYAVPQ T	36
15	C17B243	KSSQSVLNS FDNKNDLA	17	EASTRES	25	QQHWQTPL T	37
	C17B244	KSSQSVLSS ITNVNDLA	18	TASTRES	26	QQYYHDPFT	38

Ejemplo 3. Unión de anticuerpos anti-CCL17 madurados por afinidad a CCL17 humano y de cyno.

Se evaluaron anticuerpos en cuanto a su unión a CCL17 humana y CCL17 de cyno mediante el uso de afinidad de equilibrio de solución (SEA). El procedimiento para estos experimentos fue similar al usado por Haenel et al (Haenel *et al.*, *Anal Biochem* 339:182-184, 2005). Para preparar los complejos antígeno-anticuerpo, CCL17 humano o CCL17 de cyno se diluyó

serialmente en solución reguladora salina basada en Tris que contiene 0,05 % de Tween-20, TBST, (Thermo Scientific) a una relación de 1:6 comenzando a una concentración de 2.000.000 pM en placas de polipropileno de 96 pocillos profundos. Los volúmenes iguales de mAbs anti-
5 hCCL17a 40 pM o 200 pM se adicionaron a cada dilución de quimocina para obtener mezclas que contienen la dilución en serie de quimocinas comenzando a una concentración final de 1 μ M y una concentración constante (20 pM o 100 pM) de anticuerpo anti-CCL17. Las mezclas se prepararon por duplicado y se incubaron a 4 °C durante 48 horas para
10 alcanzar el equilibrio. El anticuerpo libre se detectó mediante el uso de un instrumento SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Discovery). Las curvas de unión resultantes se ajustaron para obtener la constante de equilibrio de disociación (K_D) mediante el uso del programa para computadoras GraphPad Prism (v 5,01) mediante el uso de un modelo de unión 1:1 para
15 llevar a cabo el análisis de regresión de mínimos cuadrados no lineales de la información. La tabla 5 muestra afinidades de los anticuerpos a CCL17 humana y de cyno. Las afinidades se encontraban en el intervalo de aproximadamente 2 pM a aproximadamente 700 pM para CCL17 humana y de aproximadamente 200 pM a aproximadamente 9500 pM para CCL17 de
20 cyno. Los anticuerpos generados se unieron a CCL17 humana con aproximadamente 2 a aproximadamente 150 veces más afinidades cuando se compara con la unión a CCL17 de cyno.

Tabla 5.

	Afinidad (pM)		Veces de unión a CCL17 humana/de cyno
	CCL17 humana	CCL17 de cyno	
Ident. de mAb			
C17F24 (original)	1000	ND*	
C17B234	2	230	115,0
C17B235	72	9497	131,9
C17B236	39	297	7,6
C17B237	657	3066	4,7
C17B238	115	1456	12,7
C17B239	92	630	6,8
C17B240	83	4596	55,4
C17B241	50	583	11,7
C17B242	167	384	2,3
C17B243	28	677	24,2
C17B244	33	565	17,1

*No determinado

Ejemplo 4. Optimización de anticuerpos de CCL17

Los anticuerpos de CCL17 C17B234 y C17B240 contuvieron un sitio de glicosilación unido a N potencial al comienzo del LCDR2 (“NAS”). El residuo de asparagina (N) en la posición de residuo 50 (numeración de Kabat) de C17B234 se mutó a seis diferentes aminoácidos (A, D, G, S, T y I).

Un motivo de isomerización de ácido aspártico potencial “DS” se identificó en la HCDR3 en C17F24 original y todas sus variantes maduras por afinidad. Para probar el efecto de sustituciones en esta posición, el residuo de serina en la posición 100c numeración de Kabat) se mutó a A, T o S o la D a la posición 100b se mutó a E en la cadena pesada de mAB C17B234. Las cadenas pesadas resultantes se aparearon con la cadena ligera de C17B258.

Los anticuerpos se expresaron como IgG1 y se midió su afinidad a CCL17 humana y de cyno. La Tabla 6 y la Tabla 7 muestran las secuencias CDR de cadena pesada y ligera de los anticuerpos optimizados. La Tabla 8 muestra la afinidad de los anticuerpos para CCL17 humana y de cyno.

- 5 Mutagénesis de N50 en la cadena ligera resultó en unión mejorada de 2 a 100 veces.

Tabla 6.

10	Ident. de mAb	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		Secuencia	identificación de secuencia núm.:	Secuencia	identificación de secuencia núm.:	Secuencia	identificación de secuencia núm.:
15	C17B27	SYWIG	4	IIDPSDSDTR YSPSFQG	5	VGPADWW DSFDY	6
	C17B28	SYWIG	4	IIDPSDSDTR YSPSFQG	5	VGPADWW DSFDY	6
	C17B20	SYWIG	4	IIDPSDSDTR YSPSFQG	5	VGPADWW DSFDY	6
	C17B22	SYWIG	4	IIDPSDSDTR YSPSFQG	5	VGPADWW DSFDY	6
	C17B23	SYWIG	4	IIDPSDSDTR YSPSFQG	5	VGPADWW DSFDY	6
	C17B24	SYWIG	4	IIDPSDSDTR YSPSFQG	5	VGPADWW DSFDY	6
	C17B23	SYWIG	4	IIDPSDSDTR YSPSFQG	5	VGPADWW DAFDY	42
	C17B24	SYWIG	4	IIDPSDSDTR YSPSFQG	5	VGPADWW DTFDY	43
	C17B25	SYWIG	4	IIDPSDSDTR YSPSFQG	5	VGPADWW ESFDY	44

20

Tabla 7.

Ident. de mAb	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
	Secuencia	identificación de secuencia núm.:	Secuencia	identificación de secuencia núm.:	Secuencia	identificación de secuencia núm.:
C17B257	KSSQSVLL	8	AASTRES	39	QQFYSPST	28

	SFDNINKLA					
C17B258	KSSQSVLL SFDNINKLA	8	DASTRES	24	QQFYSPST	28
C17B260	KSSQSVLL SFDNINKLA	8	GASTRES	22	QQFYSPST	28
C17B262	KSSQSVLL SFDNINKLA	8	SASTRES	40	QQFYSPST	28
C17B263	KSSQSVLL SFDNINKLA	8	TASTRES	26	QQFYSPST	28
C17B264	KSSQSVLL SFDNINKLA	8	IASTRES	41	QQFYSPST	28
C17B293	KSSQSVLL SFDNINKLA	8	DASTRES	24	QQFYSPST	28
C17B294	KSSQSVLL SFDNINKLA	8	DASTRES	24	QQFYSPST	28
C17B295	KSSQSVLL SFDNINKLA	8	DASTRES	24	QQFYSPST	28

Tabla 8.

Ident. de mAb	Afinidad (pM)		Veces de unión a CCL17 humana/de cyno
	CCL17 humana	CCL17 de cyno	
c17B257	0,1	65,6	656,0
C17B258	0,1	41,6	416,0
C17B260	0,5	36,4	72,8
C17B262	0,3	55,5	185,0
C17B263	0,1	75,59	755,9
C17B264	0,4	71,83	179,6
C17B293	<0,1	39	
C17B294	1	22	22,0
C17B295	175	29892	170,8

Un residuo de triptofano en HCDR3 en la posición 100a (numeración de kabat) en mAb de C17B236 se identificó como un sitio putativo para oxidación post-traslacional no deseada. Este residuo se somete a mutación

para otros 17 aminoácidos (todas excepto C y M) en la Fab original de C17B236, C17F319 que mAb es esta. Se llevó a cabo mutagénesis de Kunkel con “NNK” o oligonucleótidos de codones definidos para producir este panel. Estos Fab se analizaron, después, mediante el uso de un ELISA de clasificación para unirlos a CCL17 de bt-humana y bt-cyno. Cinco variantes (W → R, Y, F, T, I) mostraron alguna unión en una Fab que se une a ELISA (Tabla 5). El mejor de los tres se convirtieron a mAb (M17B288, C17B289, C17B290) para la expresión y MSD-SEA (Tabla 6). La mayoría de las variantes muestran afinidad reducida a la CCL17 humana y de cyno.

Las secuencias de VH y VL de los anticuerpos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9.

mAb	VH con identificación de secuencia núm.:	VL con identificación de secuencia núm.:
C17F24 (original)	45	49
C17B234	45	50
C17B235	45	51
C17B236	45	52
C17B237	45	53
C17B238	45	54
C17B239	45	55
C17B240	45	56
C17B241	45	57
C17B242	45	58
C17B243	45	59

C17B244	45	60
C17B257	45	61
C17B258	45	62
C17B260	45	63
C17B262	45	64
C17B263	45	65
C17B264	45	66
C17B293	46	62
C17B294	47	62
C17B295	48	62

Ejemplo 6. Selección de regiones constantes

Anticuerpos selectos se clonaron como IgG2 o IgG4 con las siguientes sustituciones: IgG4 S228P/L234A/L235A o IgG2 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S mediante el uso de métodos estándar. La Tabla 10 muestra los anticuerpos resultantes.

Tabla 10.

nombre de mAb	Isotipo	Regiones variables de mAb
C17B302	IgG2 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S	C17B293
C17B311	IgG4 S228P/L234A/L235A	C17B293
C17B301	IgG2 V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S	C17B294
C17B312	IgG4 S228P/L234A/L235A	C17B294

Abajo se muestran cadenas pesadas y ligeras de ciertos anticuerpos:

CB302 HC (identificación de secuencia núm.: 67)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI
 IDPSDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVGP
 ADVWDAFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
 5 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVTSSNFGTQTY
 TCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPAASSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVDVSAEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKGQPREPQVYTLPPS
 REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSF
 10 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

CB302 LC (identificación de secuencia núm.: 68)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKPGQPPK
 LLIYDASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYSPST
 15 FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
 KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
 QGLSSPVTKSFNRGEC

CB301 HC (identificación de secuencia núm.: 69)

20 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGI
 IDPSDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVGP
 ADVWDTFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVTSSNFGTQTY

TCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPAAASSVFLFPPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVVVDVSAEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPS
 REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSF
 5 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

CB301 LC (identificación de secuencia núm.: 70)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKPGQPPK
 LLIYDASTRESGVPRDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYSPST
 10 FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
 KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTH
 QGLSSPVTKSFNRGEC

Ejemplo 7. Caracterización de los anticuerpos anti-CCL17

15 Los anticuerpos selectos anti-CCL17 se caracterizaron en ensayos
 reporteros de flujo de calcio de β - arrestina y en ensayo de quimiotaxis para
 evaluar la capacidad para inhibir las actividades biológicas de CCL17.

Ensayo de flujo de calcio. El ensayo de movilización de calcio se
 usó para probar la capacidad de mAbs de hibridomas para neutralizar la
 20 señalización de CCL17. Se cultivaron células CCRF-CEM (ATCC® CCL-
 119™) en RPMI con GlutaMAX; 10 % de FBS; 10 mM de Hepes, 1 mM de
 piruvato de sodio, 4500 mg/L de glucosa y 1500 mg/ml de bicarbonato de
 sodio en incubadora a 37 °C con 5 % de saturación de CO₂. Las células se

etiquetan con colorante mediante el uso del estuche de ensayo de calcio sin enjuague Fluo-8 NW (núm. 36315) de ABD Bioquest, Inc. Se preincubaron anticuerpos y 10 ng/ml de CCL17 humana o 5 ng/ml de CCL17 de cyno con los anticuerpos de prueba y la mezcla se adicionó a las células. Se detectó
5 señal fluorescente mediante el uso de FDSS 6000 (Hamamatsu, Bridgewater, NJ) con el uso de 490 nm de excitación y 525 nm de emisión.

Ensayo reportero de β -arrestina. Se usó ensayo de β -arrestina para evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-CCL17 para neutralizar la función de CCL17. El ensayo se llevó a cabo utilizando el ensayo de β -
10 arrestina PathHunter eXpress DiscoverX). Brevemente, la capacidad de los anticuerpos anti-CCL17 para inhibir el reclutamiento de arresto de β se evaluó en células Hek293 que co-expresan CCR4 fusionadas en marco con el pequeño fragmento enzimático ProLink™ y una proteína de fusión de β -arrestina y el mutante de delección N-terminal de β -gal (denominado aceptor
15 enzimático o EA, por sus siglas en inglés). Los anticuerpos anti-CCL17 en varias concentraciones 0,15 nm - 1 μ m) se combinaron con 20 nm de CCL17 y la mezcla se incubó a 37 °C durante 20 - 30 minutos antes de agregar el complejo anticuerpo-CCL17 a las células. La mezcla, después, se aplicó a las células y se incubó a 37 °C (95 % de O₂/5 % de CO₂) durante 90
20 minutos. Se adicionó 55 μ l de reactivo de detección por pocillo y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se leyeron en un lector de placa de luminiscencia estándar y se calcularon los valores de IC₅₀.

Ensayo de quimiotaxis: El ensayo de quimiotaxis se usó para

demostrar que los anticuerpos anti-CCL17 inhiben la función de CCL17. La migración de las células HSC-F (las células HSC-F se obtuvieron de la NIH Nonhuman Primate Reagent Resource) o las células CCRF-CEM (ATCC® CCL-119™) se evaluaron mediante el uso de una cámara de quimiotaxis de 96 pocillos mediante el uso de un filtro de policarbonato de 5 µm de acuerdo con el protocolo descrito en Imai et al. 1997; Imai et al. 1999. Brevemente, las cámaras inferiores se llenaron con 320 µl de RPMI/BSA al 0,1 % y 1 nM de la CCL17 humana o de cyno sin o con diferentes concentraciones de los anticuerpos 0,125, 0,25, 0,5 1 y 10 µg/ml) y, después, se superpusieron cuidadosamente con la membrana de policarbonato. Las células se lavaron con PBS y se suspendieron en RPMI/BSA al 0,1 % a $0,5 \times 10^6$ células/ml, y la suspensión celular se adicionó a las cámaras superiores. Las cámaras se incubaron durante 60 min en una incubadora humidificada de 5 % de CO₂ a 37 °C, y las células que migran a través de la membrana en la cámara inferior se determinaron mediante el uso de la viabilidad celular de luminiscencia Cell Titer-Glo.

La Tabla 11 muestra los valores de IC₅₀ para el ensayo de flujo de calcio. Los datos son un porcentaje de los tres experimentos independientes. Cada mAb neutralizó completamente el flujo de calcio inducido por CCL17 humana o de cyno mediante el uso de 10 ng/ml (1,25 nM) de CCL17 humana o 5 ng/ml (0,625 nM) de CCL17 de cyno y como se muestra en la Tabla 11, los valores de IC₅₀ fueron levemente equivalentes para cada uno de los anticuerpos contra la proteína humana y de cyno.

Tabla 11.

mAb	IC ₅₀ (nM)	
	CCL17 humana	CCL17 de cyno
C17B302	0,593	0,238
C17B311	0,553	0,239
C17B318	0,275	0,237
C17B319	0,753	0,289
C17B234	0,421	0,369
C17B235	0,558	0,919
C17B236	0,385	0,349
C17B237	0,882	0,549
C17B238	0,387	0,348
C17B239	0,427	0,430
C17B240	0,405	0,308
C17B241	0,456	0,339
C17B242	0,483	0,340
C17B243	0,231	0,310
C17B244		0,311

La tabla 12 muestra los valores de IC₅₀ para el ensayo de β -

arrestina. Los datos son un porcentaje de los tres experimentos

independientes. Todos los mAb fueron capaces de inhibir completamente el

reclutamiento de β - arrestina inducido por CCL17 humana o de cyno a

20 nM y a inhibir dependiendo de la dosis el reclutamiento de β -arrestina

inducido por CCL17 humana o de cyno con potencia equivalente.

Tabla 12.

	CCL17 humana		CCL17 de cyno	
	IC ₅₀ (nM)	STD	IC ₅₀ (nM)	STD
C17B302	13,94	9,56	13,412	6,403
C17B311	10,65	2,89	10,324	2,569
C17B318	11,006	2,886	12,141	2,294
C17B319	14,225	4,133	17,51	6,605
C17B234	8,42	5,525	5,391	0,0431
C17B236	6,98	3,33	9,502	0,073

La Figura 1 y la Figura 2 muestran la inhibición de quimiotaxis con anticuerpos selectos en células humanas y de cyno, respectivamente. Todos los anticuerpos probados inhibieron la quimiotaxis de células CCRF-CEM inducidas por CCL17 humana a un nivel de inhibición de aproximadamente 50 % a una concentración de anticuerpo de 0,5 µg/ml. C17B302 y C17B311 inhibieron la quimiotaxis de célula HSC-F de cyno inducida por CCL17 de cyno a un nivel de inhibición de aproximadamente 50 % a concentración de anticuerpo de 0,5 µg/ml.

Ejemplo 8. Mapeo de epítipo de anticuerpo anti-CCL17 C17B236

El epítipo de unión del anticuerpo C17B236 (VH: identificación de secuencia núm.: 45; VL: identificación de secuencia núm.: 52) se determinó por cristalografía de rayos X.

La CCL17 humana se expresó en *E. coli*, aislada de cuerpos de inclusión y replegada. El fragmento de Fab de C17B236 de mAb se expresó en células HEK293F. La CCL17: Se preparó el complejo de C17B236 al mezclar en una relación molar de 1,6:1 con un exceso de CCL17. El complejo, después, se purificó por cromatografía de exclusión de tamaño. El complejo se cristalizó por el método de difusión de vapor a partir de una solución que contenía 20 % de PEG 3350 y 0,2 M K/Na de tartrato. Los datos de diferenciación de rayos X se recolectaron a una resolución de 1,9 Å. La estructura se determinó por reemplazo molecular y se refinó a un factor R de 18,0 %.

El epítipo C17B236 es conformacional y abarca 3 segmentos de la molécula de CCL17, a saber, dos bucles (residuos 21-23 y 44-45) y la hélice C-terminal (residuos 60-68). Las interacciones clave incluyen los residuos básicos Arg22 y Lys23 de CCL17 y un agrupamiento de residuos ácidos en HCDR2 que incluyen Asp52, Asp55 y Asp57. Además de estas interacciones electrostáticas, los contactos van-der-Waals en el centro del epítipo ocurren entre Trp33 y Trp105 de VH y Arg22 de CCL17. Dado el número de contactos, el residuo clave del epítipo es Arg22, que se apila contra Trp33 de VH y hace numerosos contactos con HCDR3. Los residuos de parátipo y epítipo se muestran en la Figura 7.

El parátipo (residuos de anticuerpos incluidos en la unión a CCL17) incluye 18 residuos que pertenecen a 5 de las 6 CDR (todas excepto LCDR2).

El epítipo C17B236 está en el lado opuesto del monómero de CCL17 desde su superficie de dimerización. Entonces, C17B236 no bloquea

la dimerización de CCL17. El efecto de neutralización del C17B236 resulta de la competencia con CCR4 para los epítomos superpuestos.

Secuencias:

5

10

15

20

Sec.Con número. de ident.	Tipo	Especies	Descripción	Secuencia
1	PRT	Homo sapiens	CCL17	argtnvgreccleyfkga iplrklktwyqtsedcsrd aivfvtvqgraicsdpnn krvknvskyqlsers
2	PRT	Cyno	CCL17	margtnvgrecclyfkga aiplrklktwyqtsedcsr daivfvtvqnkaicsdpn dkkvkkalkylsers
3	PRT	cyno	CCL22	gpyganmedsvccrd yvryrmprrvkhfywts dscprpgvlltsrdkeic adprvpwvkmilnksq
4	PRT	Secuencia artificial	HCDR1 fo C17F24	SYWIG
5	PRT	Secuencia artificial	HCDR2 de C17F24	IIDPSDSDTRYSP SFQG
6	PRT	Secuencia artificial	HCDR3 de C17F24	VGPADWDSFDY
7	PRT	Secuencia artificial	LCDR1 de C17F24 (original)	KSSQSVLYSSNN KNYLA
8	PRT	Secuencia artificial	LCDR1 de C17B234	KSSQSVLLSFDNI NKLA
9	PRT	Secuencia artificial	LCDR1 de C17B235	KSSQSVLYSFYN FNALA
10	PRT	Secuencia artificial	LCDR1 de C17B236	KSSQSVLLSPWN SNQLA
11	PRT	Secuencia	LCDR1 de	KSSQSVLTSYNN

		artificial	C17B237	SNYLA
12	PRT	Secuencia artificial	LCDR1 de C17B238	KSSQSVLISAFNQ NPLA
13	PRT	Secuencia artificial	LCDR1 de C17B239	KSSQSVLSSFTN TNTLA
14	PRT	Secuencia artificial	LCDR1 de C17B240	KSSQSVLYSHVN YNALA
15	PRT	Secuencia artificial	LCDR1 de C17B241	KSSQSVLNSFTN NNALA
16	PRT	Secuencia artificial	LCDR1 de C17B242	KSSQSVLFSHDN LNTLA
17	PRT	Secuencia artificial	LCDR1 de C17B243	KSSQSVLNSFDN KNDLA
18	PRT	Secuencia artificial	LCDR1 de C17B244	KSSQSVLSSITNV NDLA
19	PRT	Secuencia artificial	LCDR2 de C17F24 (original)	WASTRES
20	PRT	Secuencia artificial	LCDR2 de C17B234	NASTRES
21	PRT	Secuencia artificial	LCDR2 de C17B235	HASTRES
22	PRT	Secuencia artificial	LCDR2 de C17B236	GASTRES
23	PRT	Secuencia artificial	LCDR2 de C17B237	LASTRES
24	PRT	Secuencia artificial	LCDR2 de C17B238	DASTRES
25	PRT	Secuencia artificial	LCDR2 de C17B241	EASTRES
26	PRT	Secuencia artificial	LCDR2 de C17B244	TASTRES
27	PRT	Secuencia artificial	LCDR3 de C17F24 (original)	QQYYSTPLT
28	PRT	Secuencia artificial	LCDR3 de C17B234	QQFYSPST
29	PRT	Secuencia artificial	LCDR3 de C17B235	QQFYATPFT

5	30	PRT	Secuencia artificial	LCDR3 de C17B236	QQYYLIPST
	31	PRT	Secuencia artificial	LCDR3 de C17B237	QQYLSPST
	32	PRT	Secuencia artificial	LCDR3 de C17B238	QQYQFIPFT
	33	PRT	Secuencia artificial	LCDR3 de C17B239	QQYLIYPST
	34	PRT	Secuencia artificial	LCDR3 de C17B240	QQYYTLPAT
10	35	PRT	Secuencia artificial	LCDR3 de C17B241	QQTNSIPLT
	36	PRT	Secuencia artificial	LCDR3 de C17B242	QQYYAVPQT
	37	PRT	Secuencia artificial	LCDR3 de C17B243	QQHWQTPLT
	38	PRT	Secuencia artificial	LCDR3 de C17B244	QQYYHDPFT
	39	PRT		LCDR2 de C17B257	AASTRES
15	40	PRT		LCDR2 de C17B262	SASTRES
	41	PRT		LCDR2 de C17B264	IASTRES
	42	PRT		HCDR3 de C17B293	VGPADVWDAFDY
	43	PRT		HCDR3 de C17B294	VGPADVWDTFDY
	44	PRT		HCDR3 de C17B295	VGPADVWESFDY
20	45	PRT	Homo sapiens	VH de C17F24, C17B234, C17B235, C17B236, C17B237, C17B238, C17B239, C17B240,	EVQLVQSGAEVK KPGESLKISCKGS GYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWM GIIDPSDSSTRYS PSFQGQVTISAD KSISTAYLQWSSL KASDTAMYCAR

5				C17B241, C17B242, C17B243, C17B244, C17B257, C17B258, C17B260, C17B262, C17B266, C17B264	VGPADVWDSFD YWGGQGLTVTVSS
	46	PRT	Homo sapiens	VH de C17M293	EVQLVQSGAEVK KPGESLKISCKGS GYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWM GIIDPSDSDTRY PSFQGQVTISAD KSISTAYLQWSSL KASDTAMY YCAR VGPADVWDAFD YWGGQGLTVTVSS
10					
15	47	PRT	Homo sapiens	VH de C17B294	EVQLVQSGAEVK KPGESLKISCKGS GYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWM GIIDPSDSDTRY PSFQGQVTISAD KSISTAYLQWSSL KASDTAMY YCAR VGPADVWDTFDY WGQGLTVTVSS
20	48	PRT	Homo sapiens	VH de C17B295	EVQLVQSGAEVK KPGESLKISCKGS GYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWM GIIDPSDSDTRY PSFQGQVTISAD KSISTAYLQWSSL KASDTAMY YCAR VGPADVWESFDY WGQGLTVTVSS
	49	PRT	Homo sapiens	VL de C17F24 (original)	DIVMTQSPDSLAV SLGERATINCKSS QSVLYSSNNKNY

				LAWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESG VPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAED VAVYYCQQYYST PLTFGQGTKVEIK
5				
50	PRT	Homo sapiens	VL de C17B234	DIVMTQSPDSLAV SLGERATINCKSS QSVLLSFDNINKL AWYQQKPGQPP KLLIYNASTRESG VPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAED VAVYYCQQFYVS PSTFGQGTKVEIK
10				
51	PRT	Homo sapiens	VL de C17B235	DIVMTQSPDSLAV SLGERATINCKSS QSVLYSFYNFNL AWYQQKPGQPP KLLIYHASTRESG VPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAED VAVYYCQQFYAT PFTFGQGTKVEIK
15				
52	PRT	Homo sapiens	VL de C17B236	DIVMTQSPDSLAV SLGERATINCKSS QSVLLSPWNSNQ LAWYQQKPGQPP KLLIYGASTRESG VPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAED VAVYYCQQYYLIP STFGQGTKVEIK
20				
53	PRT	Homo sapiens	VL de C17B237	DIVMTQSPDSLAV SLGERATINCKSS QSVLTSYNNSNYL AWYQQKPGQPP KLLIYLASTRESG VPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAED VAVYYCQQYLSP PSTFGQGTKVEIK
54	PRT	Homo	VL de C17B238	DIVMTQSPDSLAV

5

10

15

20

				PQTFGQGTKVEIK
59	PRT	Homo sapiens	VL de C17B243	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLNSFDNKNDLAWYQQKPGQPPKLLIYEASTRESGVDPDRFSGSGGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQQHWQTPLTFGQGTKVEIK
60	PRT	Homo sapiens	VL de C17B244	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSITNVNDLAWYQQKPGQPPKLLIYTASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYHPFTFGQGTKVEIK
61	PRT	Homo sapiens	VL de C17B257	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKPGQPPKLLIYAASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYSPSTFGQGTKVEIK
62	PRT	Homo sapiens	VL de C17B258	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKPGQPPKLLIYDASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYSPSTFGQGTKVEIK
63	PRT	Homo sapiens	VL de C17B260	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLLSFDNINKLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESG

5

10

15

20

				VPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAED VAVYYCQQFYVS PSTFGQGTKVEIK
64	PRT	Homo sapiens	VL de C17B262	DIVMTQSPDSLAV SLGERATINCKSS QSVLLSFDNINKL AWYQQKPGQPP KLLIYSASTRESG VPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAED VAVYYCQQFYVS PSTFGQGTKVEIK
65	PRT	Homo sapiens	VL de C17B263	DIVMTQSPDSLAV SLGERATINCKSS QSVLLSFDNINKL AWYQQKPGQPP KLLIYTASTRESG VPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAED VAVYYCQQFYVS PSTFGQGTKVEIK
66	PRT	Homo sapiens	VL de C17B264	DIVMTQSPDSLAV SLGERATINCKSS QSVLLSFDNINKL AWYQQKPGQPP KLLIYIASTRESGV PDRFSGSGSGTD FTLTISLQAEDV AVYYCQQFYVSP STFGQGTKVEIK
67	PRT	Homo sapiens	CB302 HC	EVQLVQSGAEVK KPGESLKISCKGS GYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWM GIIDPSDSDTRY PSFQQQVTISAD KSISTAYLQWSSL KASDTAMYYCAR VGPADVWDAFD YWGQGTLLTVSS ASTKGPSVFPLA

5					PCSRSTSESTAA LGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTS SNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKT VERKCCVECPPC PAPPAAASSVFLF PPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSA EDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKP REEQFNSTFRVV SVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKTKG QPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPEN NYKTTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
15	68	PRT	Homo sapiens	CB302 LC	DIVMTQSPDSLAV SLGERATINCKSS QSVLLSFDNINKL AWYQQKPGQPP KLLIYDASTRESG VPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAED VAVYYCQQFYSV PSTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASV VCLLNNFYPPREAK VQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLS KADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVT
20					

5

10

15

20

				KSFNRGEC
69	PRT	Homo sapiens	CB301 HC	EVQLVQSGAEVK KPGESLKISCKGS GYSFTSYWIGWV RQMPGKGLEWM GIIDPSDSDTRYs PSFQGQVTISAD KSISTAYLQWSSL KASDTAMYycAR VGPADVWDTFDY WGQGTlVTVSSA STKGPSVFPLAP CSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSG LYSLSsVVTVTSS NFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTV ERKCCVECPCPC APPAAASSVFLFP PKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSAE DPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVS VLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKTKG QPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPEN NYKTTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
70	PRT	Homo sapiens	CB301 LC	DIVMTQSPDSLAV SLGERATINCKSS QSVLLSFDNINKL AWYQQKPGQPP

5

				KLLIYDASTRESG VPDRFSGSGSGT DFTLTISSLQAED VAVYYCQQFYVS PSTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASV VCLLNNFYPRK VQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLS KADYEEKHKVYAC EVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
--	--	--	--	--

Se reivindica:

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17 humana, en donde comprende una región variable de cadena pesada (VH, por sus siglas en inglés) y una región variable de cadena ligera (VL, por sus siglas en inglés), en donde el anticuerpo compete para unirse a la CCL17 humana con un anticuerpo que comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 45 y la VL de identificación de secuencia núm.: 52.
2. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une a la CCL17 humana al menos dentro de los residuos de aminoácidos de CCL17 21-23, 44- 45 y 60-68 de identificación de secuencia núm.: 1.
3. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2 en donde el anticuerpo se une a la CCL17 humana en al menos los residuos R22 y K23 de identificación de secuencia núm.: 1.
4. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo bloquea la interacción CCL17/CCR4.
5. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 4, en donde el anticuerpo se une a CCL17 humana con una constante de afinidad (k_D) de aproximadamente 1×10^{-10} M o inferior, cuando la k_D se mide mediante el uso de afinidad de equilibrio de solución reguladora salina basada en tris que contiene 0,05 % de Tween-20 después de la co-incubación del anticuerpo y CCL17 humana durante 48 horas a 4 °C.

6. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo se une a la CCL17 humana con la K_D de aproximadamente 5×10^{-12} M o inferior.
7. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-6, en donde el anticuerpo se une a CCL17 de *Macaca fascicularis* (cyno) con la K_D de aproximadamente 1×10^{-8} M o inferior, cuando la K_D se mide mediante el uso de afinidad de equilibrio de solución reguladora salina basada en tris que contiene 0,05 % de Tween-20 después de co-incubación del anticuerpo y CCL17 de cyno durante 48 horas a 4 °C.
8. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo inhibe 10 ng/ml de movilización de calcio inducida por CCL17 humana en células CCRF- CEM medida mediante el uso de Fluo-8 NW con un valor de IC_{50} de aproximadamente 1×10^{-9} M o inferior.
9. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 5, en donde comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR, por sus siglas en inglés) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) y 3 (HCDR3) y regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR, por sus siglas en inglés) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) y 3 (LCDR3), en donde la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 4, 5, 42, 8, 24 and 28, respectivamente, o la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 46 y 62, respectivamente.

10. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-8, en donde comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada(HCDR, por sus siglas en inglés) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) y 3 (HCDR3) y regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR, por sus siglas en inglés) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) y 3 (LCDR3), en donde la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 4, 5, 71, 72, 73 y 74, respectivamente.
11. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 10, en donde HCDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 4, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 5 y la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 6, 42 o 43.
12. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 11, en donde LCDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 8, 9, 10, 13, 14, 15, 17 o 18, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 20, 21, 22, 24, 25 y 26 y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 28, 29, 30, 33, 34, 35, 37 o 38.
13. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 12, en donde comprende las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de
- a) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 8, 20 y 28, respectivamente;
 - b) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 9, 21 y 29, respectivamente;

- c) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 10, 22 y 30, respectivamente;
- d) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 13, 21 y 33, respectivamente;
- e) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 14, 20 y 34, respectivamente;
- f) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 15, 25 y 35, respectivamente;
- 5 g) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 17, 25 y 37, respectivamente;
- h) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 18, 26 y 38, respectivamente;
- i) identificación de secuencia núm.: 4, 5, 42, 8, 24 y 28, respectivamente; o
- j) identificación de secuencia núm.: 4, 5, 43, 8, 24 y 28, respectivamente.

14. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 10, en donde el

10 anticuerpo comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 75 y la VL de identificación de secuencia núm.: 76.

15. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 14, en donde VH comprende una secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 45, 46 o 47.

15 16. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 15, en donde VL comprende una secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 50, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60 o 62.

17. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 16, en donde el anticuerpo comprende:

- 20 a) la VH de identificación de secuencia núm.: 45 y la VL de identificación de secuencia núm.: 50, 51, 52, 55, 56, 57, 59 o 60;
- b) la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 46 y 62, respectivamente; o

c) la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 47 y 62, respectivamente.

18. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo comprende la VH que comprende la secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la VH de identificación de secuencia núm.: 46 y la VL que comprende la secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la VL de identificación de secuencia núm.: 62.

19. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-18, en donde el anticuerpo es humano o está humanizado.

20. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 19, en donde el anticuerpo es el isotipo de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

21. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 20, en donde el anticuerpo comprende una sustitución en la región Fc.

22. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 21, en donde la sustitución comprende sustitución de V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S o P331S en IgG2, o sustitución de S228P, L234A o L235A en IgG4, en donde la numeración de residuos es de conformidad con el índice EU.

23. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 22, en donde la sustitución comprende sustitución de V234A/ G237A/ P238S/ H268A/ V309L/ A330S/P331S en IgG2, o sustitución de S228P/ L234A/L235A en

IgG4, en donde la numeración de residuos es de conformidad con el índice EU.

24. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-23, y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 25. Un polinucleótido aislado que codifica la VH o la VL del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 9-24.

26. Un vector que comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 25.

10 27. Una célula huésped aislada que comprende el vector de conformidad con la reivindicación 26.

28. Un método para producir un anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 9-24, el método comprende cultivar la célula huésped de conformidad con la reivindicación 27, en condiciones en las que se produce el anticuerpo.

15 29. Un método para tratar una enfermedad mediada por CCL17, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite el anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-24, durante un tiempo suficiente para tratar la enfermedad mediada por CCL17.

20 30. El método de conformidad con la reivindicación 29, en donde la enfermedad mediada por CCL17 es una enfermedad inflamatoria.

31. El método de conformidad con la reivindicación 30 en donde la enfermedad es asma, colitis ulcerativa (UC, por sus siglas en inglés), dermatitis atópica (AD, por sus siglas en inglés) o fibrosis pulmonar idiopática (IPF).

32. Un método para tratar el asma o la hiper-reactividad de las vías aéreas; el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite un anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-24, durante un tiempo suficiente para tratar el asma.
- 5 33. Uso del anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-24, para tratamiento.
34. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-24, para usar en tratamiento.
35. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-24, para usar en el
- 10 tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad mediada por CCL17.
36. El anticuerpo para utilizar de conformidad con la reivindicación 35, en donde la enfermedad mediada por CCL17 es una enfermedad inflamatoria, asma, colitis ulcerativa (UC), dermatitis atópica (AD) o fibrosis pulmonar idiopática (IPF).
- 15 37. El anticuerpo para usar de conformidad con la reivindicación 36, en donde la enfermedad mediada por CCL17 es asma.

Resumen

La presente invención se refiere a los antagonistas que se unen específicamente a CCL17, los polinucleótidos que codifican para los anticuerpos o fragmentos, y los métodos de preparación y sus usos.

Figura 1A

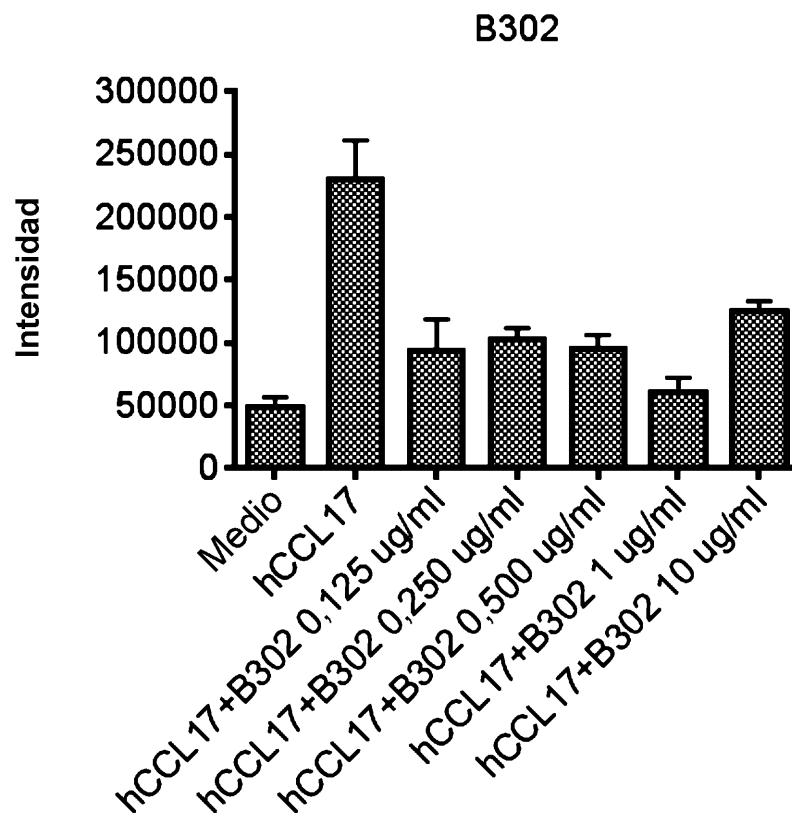


Figura 1B

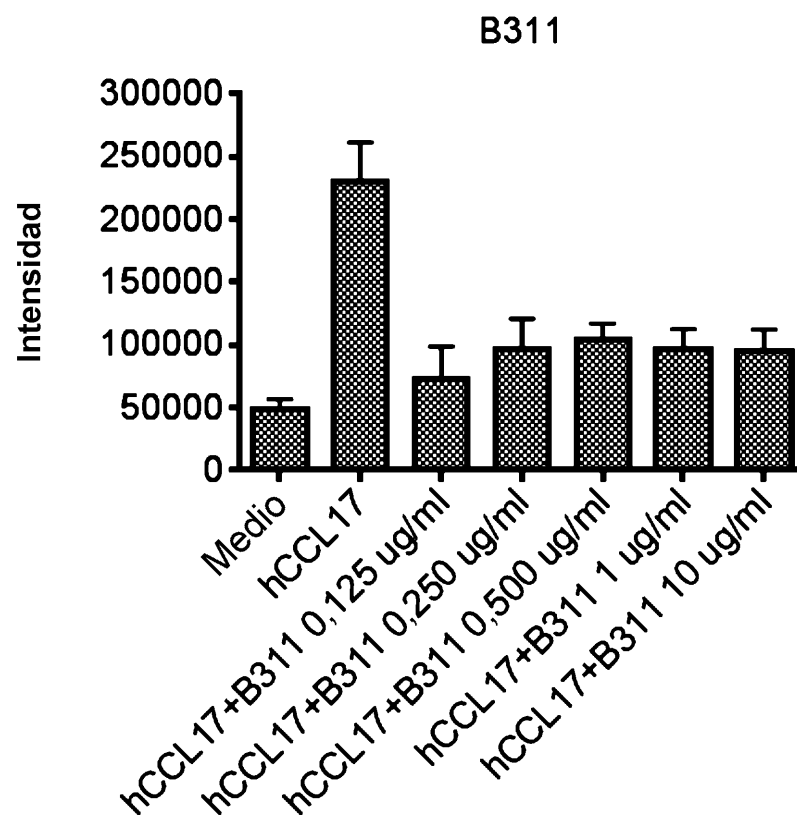


Figura 1C

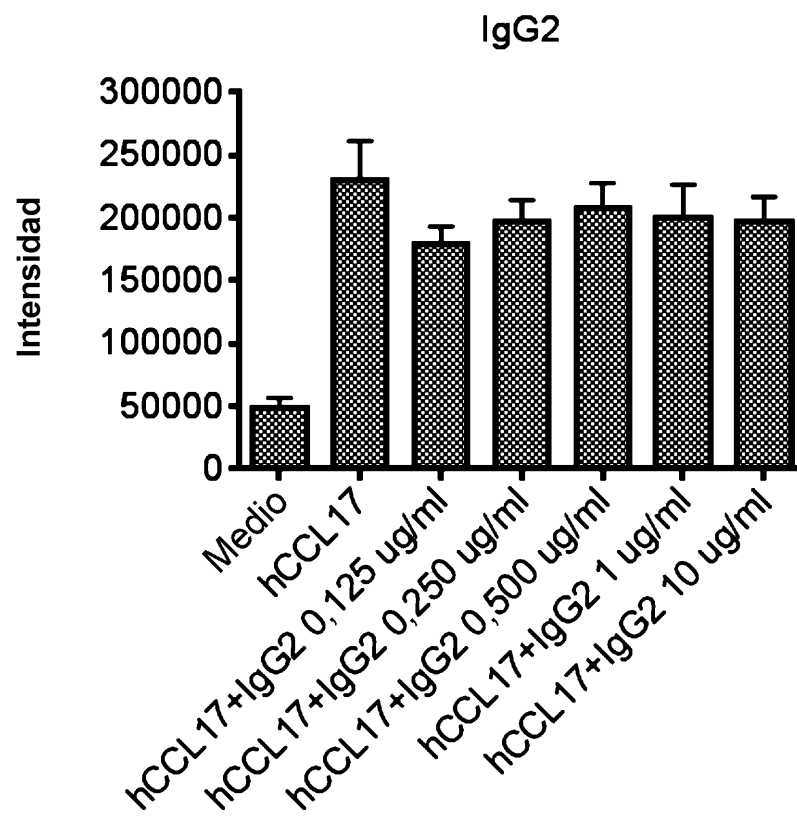


Figura 1D

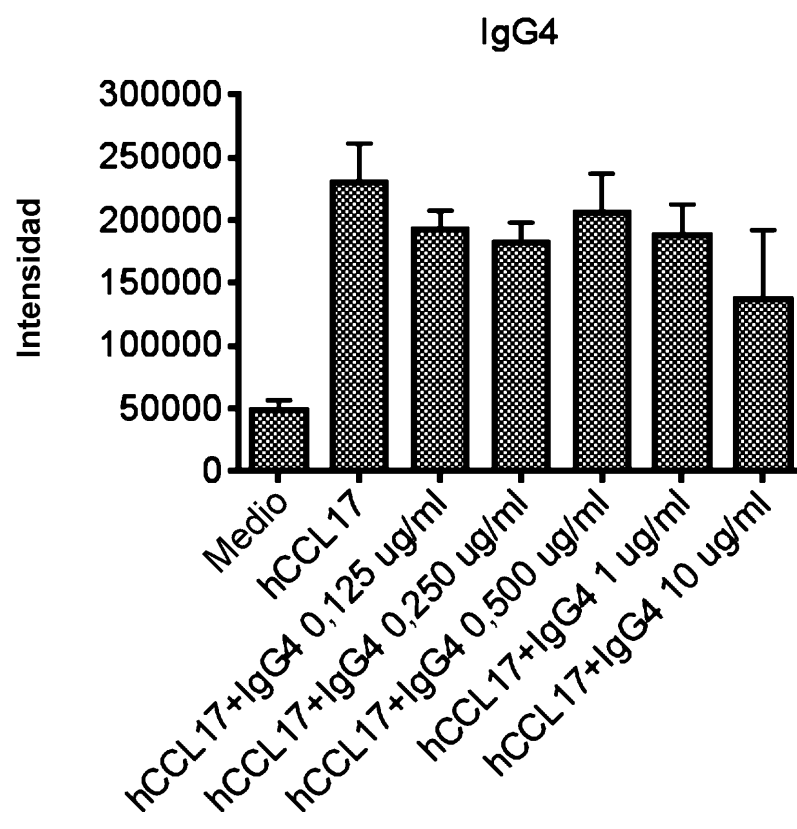


Figura 2A

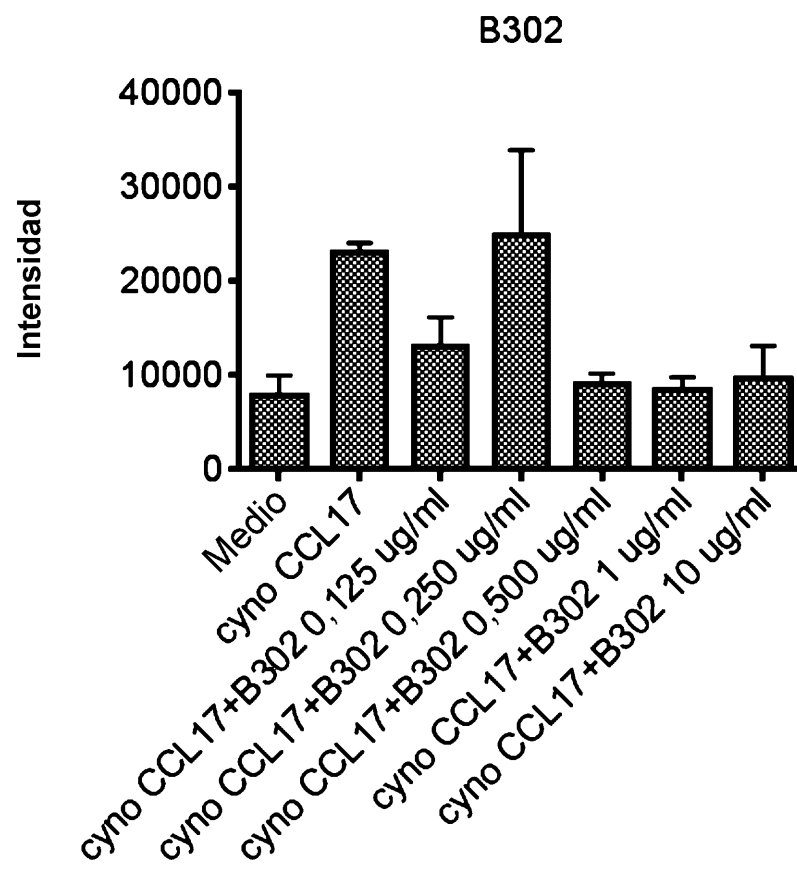


Figura 2B

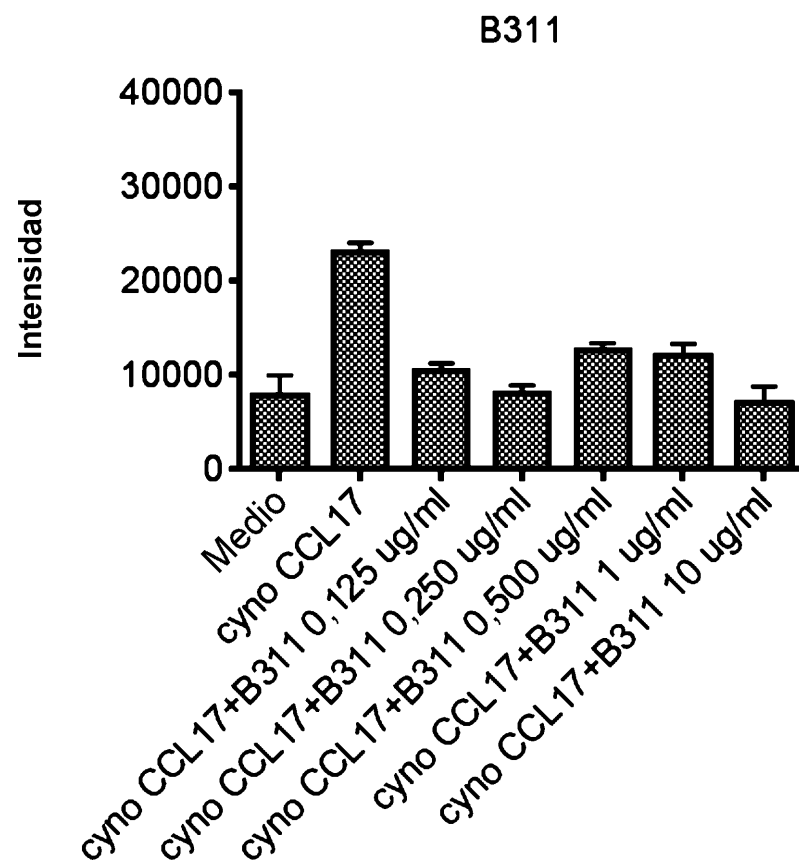


Figura 2C

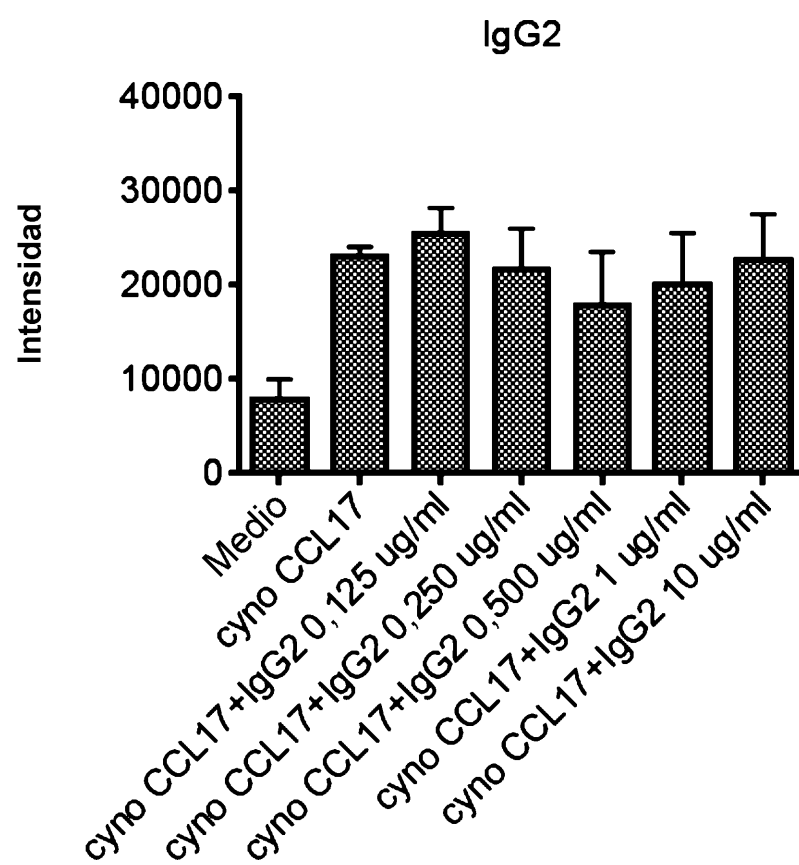


Figura 2D

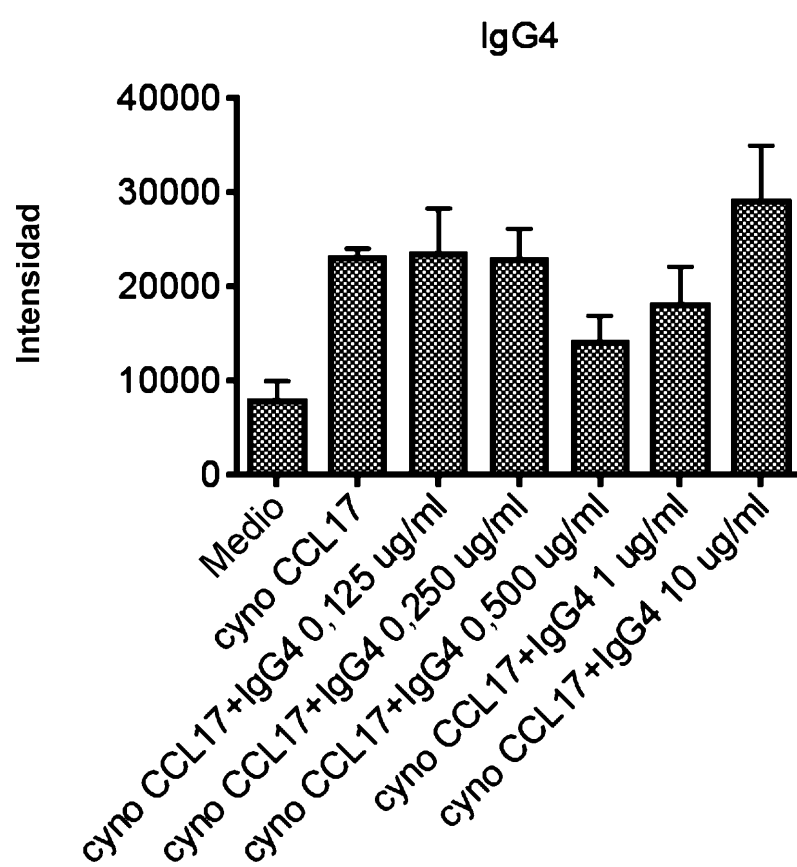


Figura 3

	1	30
C17B234_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B235_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B236_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B239_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B240_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B241_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B243_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B244_VH_45	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B293_VH_46	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	
C17B294_VH_47	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	

	31	60
C17B234_VH_45	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B235_VH_45	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B236_VH_45	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B239_VH_45	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B240_VH_45	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B241_VH_45	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B243_VH_45	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B244_VH_45	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B293_VH_46	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	
C17B294_VH_47	<u>SYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRY</u>	

Figura 3 (cont.)

	61	90
C17B234_VH_45	SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B235_VH_45	SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B236_VH_45	SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B239_VH_45	SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B240_VH_45	SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B241_VH_45	SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B243_VH_45	SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B244_VH_45	SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B293_VH_46	SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD	
C17B294_VH_47	SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD	

	91	121
C17B234_VH_45	TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS	
C17B235_VH_45	TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS	
C17B236_VH_45	TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS	
C17B239_VH_45	TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS	
C17B240_VH_45	TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS	
C17B241_VH_45	TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS	
C17B243_VH_45	TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS	
C17B244_VH_45	TAMYYCARVGPADVWDSFDYWGQGLVTVSS	
C17B293_VH_46	TAMYYCARVGPADVWDAFDYWGQGLVTVSS	
C17B294_VH_47	TAMYYCARVGPADVWDTFDYWGQGLVTVSS	
	*****:	

Figura 4

VH secuencia de consenso (identificación de secuencia núm.: 75)
 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDT
 RYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVGPADVWDX₁FDYWGGQT
 LVTVSS

en donde

X₁ es S, A o T

HCDR1 Secuencia

SYWIG (identificación de secuencia núm.: 4)

HCDR2 Secuencia

IIDPSDSDTRYSPSFQG (identificación de secuencia núm.: 5)

HCDR3 secuencia de consenso

VGPADVWDX₁FDY (identificación de secuencia núm.: 71),

en donde

X₁ es S, A o T

Figura 5

	1	30
C17B234_VL_50	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B235_VL_51	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B236_VL_52	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B239_VL_55	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B240_VL_56	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B241_VL_57	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B243_VL_59	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B244_VL_60	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B293_VL_62	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	
C17B294_VL_62	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVL	

	31	60
C17B234_VL_50	LSFDNINKLAWYQQKPGQPPKLLIYNASTR	
C17B235_VL_51	YSFYNFNALAWYQQKPGQPPKLLIYHASTR	
C17B236_VL_52	LSPWNSNQLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTR	
C17B239_VL_55	SSFTNTNTLAWYQQKPGQPPKLLIYHASTR	
C17B240_VL_56	YSHVNYNALAWYQQKPGQPPKLLIYNASTR	
C17B241_VL_57	NSFTNNNALAWYQQKPGQPPKLLIYEASTR	
C17B243_VL_59	NSFDNKNDLAWYQQKPGQPPKLLIYEASTR	
C17B244_VL_60	SSITNVNDLAWYQQKPGQPPKLLIYTASTR	
C17B293_VL_62	LSFDNINKLAWYQQKPGQPPKLLIYDASTR	
C17B294_VL_62	LSFDNINKLAWYQQKPGQPPKLLIYDASTR	
	* * * ***** *	

Figura 5 (cont.)

	61	90
C17B234_VL_50	<u>ESGVPDRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQAEDVA	
C17B235_VL_51	<u>ESGVPDRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQAEDVA	
C17B236_VL_52	<u>ESGVPDRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQAEDVA	
C17B239_VL_55	<u>ESGVPDRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQAEDVA	
C17B240_VL_56	<u>ESGVPDRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQAEDVA	
C17B241_VL_57	<u>ESGVPDRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQAEDVA	
C17B243_VL_59	<u>ESGVPDRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQAEDVA	
C17B244_VL_60	<u>ESGVPDRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQAEDVA	
C17B293_VL_62	<u>ESGVPDRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQAEDVA	
C17B294_VL_62	<u>ESGVPDRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQAEDVA	

	91	113
C17B234_VL_50	VYYC <u>QQFY</u> SVPSTFGQGTKVEIK	
C17B235_VL_51	VYYC <u>QQFY</u> ATPFTFGQGTKVEIK	
C17B236_VL_52	VYYC <u>QQYY</u> LIPSTFGQGTKVEIK	
C17B239_VL_55	VYYC <u>QQYLI</u> YPSTFGQGTKVEIK	
C17B240_VL_56	VYYC <u>QQYYT</u> LPATFGQGTKVEIK	
C17B241_VL_57	VYYC <u>QQTNS</u> IPLTFGQGTKVEIK	
C17B243_VL_59	VYYC <u>QQHWQ</u> TPLTFGQGTKVEIK	
C17B244_VL_60	VYYC <u>QQYYH</u> DPFTFGQGTKVEIK	
C17B293_VL_62	VYYC <u>QQFY</u> SVPSTFGQGTKVEIK	
C17B294_VL_62	VYYC <u>QQFY</u> SVPSTFGQGTKVEIK	

Figura 6A

VL secuencia de consenso (identificación de secuencia núm.: 76)
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLX₁SX₂X₃NX₄NX₅LAWYQQKPGQPPKLLIY
 X₆ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQX₇X₈X₉X₁₀PX₁₁TFGQGT
 KVEIK; en donde

- X₁ es L, Y, S o N;
- X₂ es F, P, H o I;
- X₃ es D, Y, W, T o V;
- X₄ es I, F, S, T, Y, N, K o V;
- X₅ es K, A, Q, T o D;
- X₆ es N, H, G, E, T o D;
- X₇ es F, Y, T o H;
- X₈ es Y, L, N o W;
- X₉ es S, A, L, I, T, Q o H;
- X₁₀ es V, T, I, Y, L o D; y
- X₁₁ es S, F, A o L.

Figura 6B

LCDR1 secuencia de consenso :

KSSQSVLX₁SX₂X₃NX₄NX₅LA (identificación de secuencia núm.: 72),

en donde

X₁ es L, Y, S o N;

X₂ es F, P, H o I;

X₃ es D, Y, W, T o V;

X₄ es I, F, S, T, Y, N, K o V; y

X₅ es K, A, Q, T o D;

LCDR2 secuencia de consenso:

X₁ASTRE (identificación de secuencia núm.: 73),

en donde

X₁ es N, H, G, E, T o D.

LCDR3 secuencia de consenso:

QQX₁X₂X₃X₄PX₅T (identificación de secuencia núm.: 74);

en donde

X₁ es F, Y, T o H;

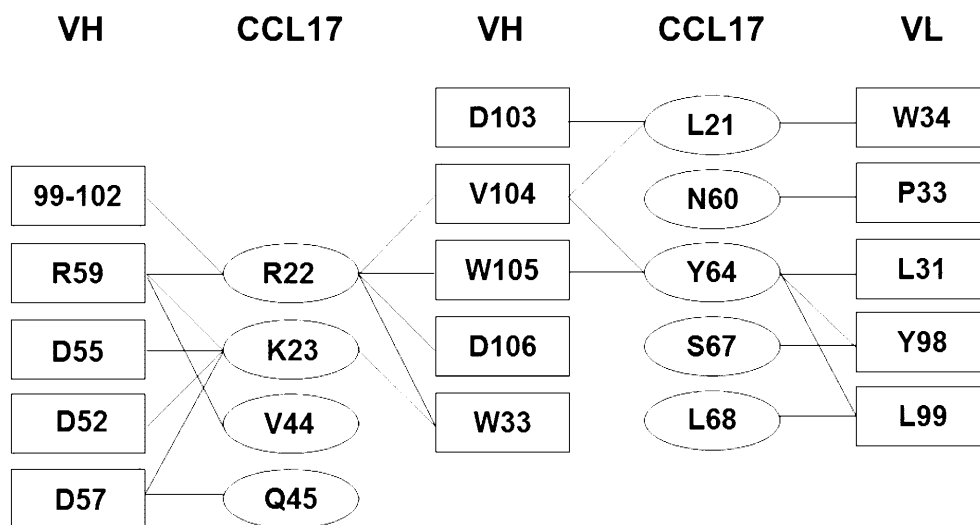
X₂ es Y, L, N o W;

X₃ es S, A, L, I, T, Q o H;

X₄ es V, T, I, Y, L o D; y

X₅ es S, F, A o L.

Figura 7



Se reivindica:

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17 humana, en donde comprende una región variable de cadena pesada (VH, por sus siglas en inglés) y una región variable de cadena ligera (VL, por sus siglas en inglés), en donde el anticuerpo compete para unirse a la CCL17 humana con un anticuerpo que comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 45 y la VL de identificación de secuencia núm.: 52.
2. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une a la CCL17 humana al menos dentro de los residuos de aminoácidos de CCL17 21-23, 44- 45 y 60-68 de identificación de secuencia núm.: 1.
3. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2 en donde el anticuerpo se une a la CCL17 humana en al menos los residuos R22 y K23 de identificación de secuencia núm.: 1.
4. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo bloquea la interacción CCL17/CCR4.
5. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 4, en donde el anticuerpo se une a CCL17 humana con una constante de afinidad (k_D) de aproximadamente 1×10^{-10} M o inferior, cuando la k_D se mide mediante el uso de afinidad de equilibrio de solución reguladora salina basada en tris que contiene 0,05 % de Tween-20 después de la co-incubación del anticuerpo y CCL17 humana durante 48 horas a 4 °C.

6. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo se une a la CCL17 humana con la K_D de aproximadamente 5×10^{-12} M o inferior.
7. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-6, en donde el anticuerpo se une a CCL17 de *Macaca fascicularis* (cyno) con la K_D de aproximadamente 1×10^{-8} M o inferior, cuando la K_D se mide mediante el uso de afinidad de equilibrio de solución reguladora salina basada en tris que contiene 0,05 % de Tween-20 después de co-incubación del anticuerpo y CCL17 de cyno durante 48 horas a 4 °C.
8. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo inhibe 10 ng/ml de movilización de calcio inducida por CCL17 humana en células CCRF- CEM medida mediante el uso de Fluo-8 NW con un valor de IC_{50} de aproximadamente 1×10^{-9} M o inferior.
9. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 5, en donde comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR, por sus siglas en inglés) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) y 3 (HCDR3) y regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR, por sus siglas en inglés) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) y 3 (LCDR3), en donde la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 4, 5, 42, 8, 24 and 28, respectivamente, o la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 46 y 62, respectivamente.

10. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-8, en donde comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada(HCDR, por sus siglas en inglés) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) y 3 (HCDR3) y regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR, por sus siglas en inglés) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) y 3 (LCDR3), en donde la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 4, 5, 71, 72, 73 y 74, respectivamente.
11. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 10, en donde HCDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 4, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 5 y la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 6, 42 o 43.
12. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 11, en donde LCDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 8, 9, 10, 13, 14, 15, 17 o 18, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 20, 21, 22, 24, 25 y 26 y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 28, 29, 30, 33, 34, 35, 37 o 38.
13. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 12, en donde comprende las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de
- a) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 8, 20 y 28, respectivamente;
 - b) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 9, 21 y 29, respectivamente;

- c) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 10, 22 y 30, respectivamente;
- d) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 13, 21 y 33, respectivamente;
- e) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 14, 20 y 34, respectivamente;
- f) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 15, 25 y 35, respectivamente;
- 5 g) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 17, 25 y 37, respectivamente;
- h) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 18, 26 y 38, respectivamente;
- i) identificación de secuencia núm.: 4, 5, 42, 8, 24 y 28, respectivamente; o
- j) identificación de secuencia núm.: 4, 5, 43, 8, 24 y 28, respectivamente.

14. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 10, en donde el

10 anticuerpo comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 75 y la VL de identificación de secuencia núm.: 76.

15. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 14, en donde VH comprende una secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 45, 46 o 47.

15 16. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 15, en donde VL comprende una secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 50, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60 o 62.

17. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 16, en donde el anticuerpo comprende:

- 20 a) la VH de identificación de secuencia núm.: 45 y la VL de identificación de secuencia núm.: 50, 51, 52, 55, 56, 57, 59 o 60;
- b) la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 46 y 62, respectivamente; o

c) la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 47 y 62, respectivamente.

18. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo comprende la VH que comprende la secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la VH de identificación de secuencia núm.: 46 y la VL que comprende la secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la VL de identificación de secuencia núm.: 62.

19. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-18, en donde el anticuerpo es humano o está humanizado.

20. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 19, en donde el anticuerpo es el isotipo de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

21. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 20, en donde el anticuerpo comprende una sustitución en la región Fc.

22. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 21, en donde la sustitución comprende sustitución de V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S o P331S en IgG2, o sustitución de S228P, L234A o L235A en IgG4, en donde la numeración de residuos es de conformidad con el índice EU.

23. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 22, en donde la sustitución comprende sustitución de V234A/ G237A/ P238S/ H268A/ V309L/ A330S/P331S en IgG2, o sustitución de S228P/ L234A/L235A en

IgG4, en donde la numeración de residuos es de conformidad con el índice EU.

24. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-23, y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 25. Un polinucleótido aislado que codifica la VH o la VL del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 9-24.

26. Un vector que comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 25.

10 27. Una célula huésped aislada que comprende el vector de conformidad con la reivindicación 26.

28. Un método para producir un anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 9-24, el método comprende cultivar la célula huésped de conformidad con la reivindicación 27, en condiciones en las que se produce el anticuerpo.

15 29. Un método para tratar una enfermedad mediada por CCL17, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite el anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-24, durante un tiempo suficiente para tratar la enfermedad mediada por CCL17.

20 30. El método de conformidad con la reivindicación 29, en donde la enfermedad mediada por CCL17 es una enfermedad inflamatoria.

31. El método de conformidad con la reivindicación 30 en donde la enfermedad es asma, colitis ulcerativa (UC, por sus siglas en inglés), dermatitis atópica (AD, por sus siglas en inglés) o fibrosis pulmonar idiopática (IPF).

32. Un método para tratar el asma o la hiper-reactividad de las vías aéreas; el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite un anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-24, durante un tiempo suficiente para tratar el asma.
- 5 33. Uso del anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-24, para tratamiento.
34. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-24, para usar en tratamiento.
35. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-24, para usar en el
- 10 tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad mediada por CCL17.
36. El anticuerpo para utilizar de conformidad con la reivindicación 35, en donde la enfermedad mediada por CCL17 es una enfermedad inflamatoria, asma, colitis ulcerativa (UC), dermatitis atópica (AD) o fibrosis pulmonar idiopática (IPF).
- 15 37. El anticuerpo para usar de conformidad con la reivindicación 36, en donde la enfermedad mediada por CCL17 es asma.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: Bernard F. Plantz
Johnson & Johnson
One Johnson & Johnson Plaza
New Brunswick, New Jersey 08933
United States of America

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) **2 6 FEB 2015**

Applicant's or agent's file reference
JBI5040WOPCT

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US14/64302

International filing date (day/month/year)

06 November 2014 (06.11.2014)

Priority date (day/month/year)

06 November 2013 (06.11.2013)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

IPC(8) - A61K 39/395 (2015.01)

CPC - A61K 2039/505

Applicant JANSSEN BIOTECH, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1 bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Date of completion of this opinion

10 February 2015 (10.02.2015)

Authorized officer:

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US14/64302

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
- ☒ the international application in the language in which it was filed.
- ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☐ in the international application as filed
- ☐ together with the international application in electronic form
- ☒ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US14/64302

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 7, 8, 10-17, 19-37

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 7, 8, 10-17, 19-37 are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

Claims 7, 8, 10-17 and 19-37 are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4 (a).

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 7, 8, 10-17, 19-37

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13ter.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US14/64302

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-6, 9, 18	YES
	Claims	NONE	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-6, 9, 18	YES
	Claims	NONE	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-6, 9, 18	YES
	Claims	NONE	NO

2. Citations and explanations:

Claim 1 meets the criteria set-out in PCT Articles 33(2)-(3), because the prior art does not teach or fairly suggest an isolated antibody specifically binding human CCL17 comprising a heavy chain variable region (VH) and a light chain variable region (VL), wherein the antibody competes for binding to human CCL17 with an antibody comprising the VH of SEQ ID NO: 45 and the VL of SEQ ID NO: 52.

US 2010/0278844 A1 to Balkwill, et al. (hereinafter 'Balkwill') discloses an isolated antibody (an antibody reagent (isolated antibody); paragraph [0074]) which binds human CCL17 (antibodies used for detecting CCL17 in human cancers; paragraphs [0074]-[0077]), comprising a heavy chain variable region (VH) and a light chain variable region (VL) (the antibody contains a region composed of one constant and one variable domain of each of the heavy and the light chain; paragraph [0140]). Balkwill does not disclose an antibody comprising the VH of SEQ ID NO: 45 or the VL of SEQ ID NO: 52.

WO 2011/056997 A1 (FABRUS LLC) (hereinafter 'Fabrus') discloses a sequence comprising 90.8% identity with SEQ ID NO: 45 (SEQ ID NO: 105 of the Fabrus reference comprises 90.8% identity with SEQ ID NO: 45 of the instant PCT application). Fabrus does not disclose an isolated antibody which binds human CCL17, or an antibody comprising the VH of SEQ ID NO: 45 or the VL of SEQ ID NO: 52.

WO 2009/120922 A3 (ZymoGenetics, INC.) (hereinafter 'Zymogenetics') discloses variable heavy and variable light chain regions (VL (variable light) and VH (variable heavy) domains; paragraph [0041]), a sequence comprising 89.9% identity with SEQ ID NO: 52 (SEQ ID NO: 50 of the Zymogenetics reference is 89.9% identical to SEQ ID NO: 52 of the instant PCT application). Zymogenetics does not disclose an isolated antibody which binds human CCL17, or an antibody comprising the VH of SEQ ID NO: 45 or the VL of SEQ ID NO: 52.

The prior art does not teach or fairly suggest the VH of SEQ ID NO: 45 or the VL of SEQ ID NO: 52, and sufficient motivation, based upon the previous disclosures of the Balkwill, Fabrus and Zymogenetics references does not exist to have implemented the VH of SEQ ID NO: 45 or the VL of SEQ ID NO: 52.

Claims 2-6, 9 and 18 meet the criteria set-out in PCT Articles 33(2)-(3), due to their dependency upon positive Claim 1.

Claims 1-6, 9 and 18 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: Bernard F. Plantz
 Johnson & Johnson
 One Johnson & Johnson Plaza
 New Brunswick, New Jersey 08933
 United States of America

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
 THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
 THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
 SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
 (day/month/year)

26 FEB 2015

Applicant's or agent's file reference

JBI5040WOPCT

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US14/64302

International filing date
 (day/month/year)

06 November 2014 (06.11.2014)

Applicant **JANSSEN BIOTECH, INC.**

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

How? Directly to the International Bureau of WIPO preferably through ePCT or on paper to, 34 chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: +41 22 338 82 70

For more detailed instructions, see *PCT Applicant's Guide*, International Phase, paragraphs 9.004 – 9.011.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ **With regard to any protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with any request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

The applicant may **submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority** to the International Bureau. These comments will be made available to the public after international publication. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established.

Shortly after the expiration of **18 months from the priority date**, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau before the completion of the technical preparations for international publication (Rules 90bis.1 and 90bis.3).

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for **entry into the national phase** before those designated Offices. In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months. For details about the applicable time limits, Office by Office, see www.wipo.int/pct/en/texts/time_limits.html and the *PCT Applicant's Guide*, National Chapters.

Within **19 months from the priority date**, the applicant may request that a **supplementary international search** be carried out by a different International Searching Authority that offers this service (Rule 45bis.1). The procedure for requesting supplementary international search is described in the *PCT Applicant's Guide*, International Phase, paragraphs 8.006-8.032.

Name and mailing address of the ISA/
 Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
 Commissioner for Patents
 P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
 Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300
 Telephone No. PCT OSP: 571-272-7774

PCT/US2014/064302 26.02.2015
PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference JBI5040WOPCT	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US14/64302	International filing date (day/month/year) 06 November 2014 (06.11.2014)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 06 November 2013 (06.11.2013)
Applicant JANSSEN BIOTECH, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1
☒ as suggested by the applicant.
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2014/064302 26.02.2015

International application No.

PCT/US14/64302

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

- ☐ on paper
☒ in electronic form

b. (time)

- ☐ in the international application as filed
☐ together with the international application in electronic form
☒ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT **PCT/US2014/064302 26.02.2015**

International application No.

PCT/US14/64302

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 7, 8, 10-17, 19-37
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search 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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2014/064302 26.02.2015

International application No.

PCT/US14/64302

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/395 (2015.01) CPC - A61K 2039/505 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(8): C07K 16/00; A61K 39/395 (2015.01) CPC: A61K 2039/505, 38/00; C07K 2317/24, 2316/96; USPC: 424/130.1; 530/387.1, 386, 380 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 practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google Scholar; ScienceDirect; PubMed; 'CCL17,' antibody, 'variable light chain,' 'variable heavy chain'														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT														
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
A	US 2010/0278844 A1 (BALKWILL, F et al.) November 4, 2010; paragraphs [0074]-[0077]	1-6, 9, 18												
A	WO 2011/056997 A1 (FABRUS LLC et al.) May 12, 2011; SEQ ID NO: 105	1-6, 9, 18												
A	WO 2009/120922 A3 (ZYMOGENETICS, INC.) December 17, 2009; paragraph [0041]; SEQ ID NO: 50	1-6, 9, 18												
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐														
<table border="0"><tr><td>* Special categories of cited documents:</td><td>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td></tr><tr><td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td><td>"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</td></tr><tr><td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td><td>"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</td></tr><tr><td>"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)</td><td>"&" document member of the same patent family</td></tr><tr><td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td><td></td></tr><tr><td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td><td></td></tr></table>			* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	"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)	"&" document member of the same patent family	"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	
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention													
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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													
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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													
"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)	"&" document member of the same patent family													
"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														
Date of the actual completion of the international search 10 February 2015 (10.02.2015)		Date of mailing of the international search report 26 FEB 2015												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774												

PATENT COOPERATION TREATY

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION,
OBTENTION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

PLANTZ, Bernard F.
Johnson & Johnson
One Johnson & Johnson Plaza
New Brunswick, New Jersey 08933
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (<i>day/month/year</i>) 02 December 2014 (02.12.2014)	
Applicant's or agent's file reference JB15040WOPCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2014/064302	International filing date (<i>day/month/year</i>) 06 November 2014 (06.11.2014)
International publication date (<i>day/month/year</i>) Not yet published	Priority date (<i>day/month/year</i>) 06 November 2013 (06.11.2013)
Applicant JANSSEN BIOTECH, INC.	

The applicant is hereby notified of the date of receipt (or of obtaining by the International Bureau) of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to the date of receipt, **the priority document concerned was submitted or transmitted to or obtained by the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis)**. This Form replaces any previously issued notification concerning submission, transmittal or obtaining of priority documents.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
06 November 2013 (06.11.2013)	61/900,596	US	24 November 2014 (24.11.2014)

The letters "NR" denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received or obtained by the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis). Where the applicant has failed to either submit, request to prepare and transmit, or to request the International Bureau to obtain the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

An asterisk "*" next to a date of receipt, denotes a priority document submitted or transmitted to or obtained by the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a); the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b) or the request to the International Bureau to obtain the priority document was made after the applicable time limit under Rule 17.1(b-bis)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a), (b) or (b-bis), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 70 90	Authorized officer Kihwan Moon e-mail pt01.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 01
---	--



- (51) **International Patent Classification:**
A61K 39/395 (2006.01)
- (21) **International Application Number:**
PCT/US2014/064302
- (22) **International Filing Date:**
6 November 2014 (06.11.2014)
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:**
61/900,596 6 November 2013 (06.11.2013) US
- (71) **Applicant:** JANSSEN BIOTECH, INC. [US/US];
800/850 Ridgeview Drive, Horsham, Pennsylvania 19044 (US).
- (72) **Inventors:** BOAKYE, Ken; 1400 McKean Road, Spring House, Pennsylvania 19477 (US). DEL VECCHIO, Alfred; 1400 McKean Road, Spring House, Pennsylvania 19477 (US). KEHOE, John; 1400 McKean Road, Spring House, Pennsylvania 19477 (US). LACY, Eilyn; 1400

McKean Road, Spring House, Pennsylvania 19477 (US). MURRAY, Lynne; Cherry Cottage, 137 High Street, Melbourn Cambridgeshire SG8 6AR (GB). RYAN, Mary; 1400 McKean Road, Spring House, Pennsylvania 19477 (US). SANTULLI-MAROTTO, Sandra; 1400 McKean Road, Spring House, Pennsylvania 19477 (US). WHEELER, John; 1400 McKean Road, Spring House, Pennsylvania 19477 (US). WHITAKER, Brian; 1400 McKean Road, Spring House, Pennsylvania 19477 (US). TEPLYAKOV, Alexey; 1400 McKean Drive, Spring House, Pennsylvania 19477 (US).

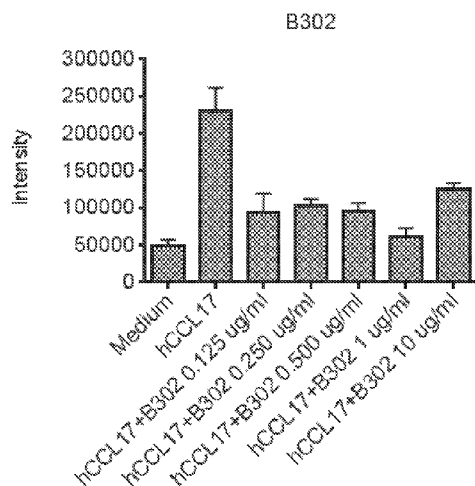
(74) **Agents:** PLANTZ, Bernard F. et al.; Johnson & Johnson, One Johnson & Johnson Plaza, New Brunswick, New Jersey 08933 (US).

(81) **Designated States** (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,

[Continued on next page]

(54) **Title:** ANTI-CCL17 ANTIBODIES

Figure 1A.



(57) **Abstract:** The present invention relates to antibodies specifically binding CCL17, polynucleotides encoding the antibodies or fragments, and methods of making and using the foregoing.



MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,

SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- *as to the identity of the inventor (Rule 4.17(i))*
- *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*
- *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

Published:

- *with international search report (Art. 21(3))*

Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe, traductora e intérprete oficial según resolución No. 0369 de 1995 del Ministerio de Justicia, del documento correspondiente a un documento de cesión otorgado a favor de la sociedad **JANSSEN BIOTECH, INC.**, domiciliada en Horsham, Pensilvania, Estados Unidos de América.

Archivo No. Jb15040

Inventores Conjuntos

CESIÓN

CONSIDERANDO que Ken Boakye, Alfred Del Vecchio, John Kehoe, Eilyn Lacy, Mary Ryan, Sandra Santulli-Marotto, John Wheeler, Brian Whitaker y Alexey Teplyakov, con domicilio de negocios en Spring House, Pensilvania y Lynne Murray, con domicilio de negocios en Melbourn, Reino Unido (de ahora en adelante denominados "Cedentes"), han realizado ciertos novedosos y útiles inventos o descubrimientos relacionados con

ANTICUERPOS ANTI-CCL17

Para el cual han presentado una solicitud para Título de Patente en los Estados Unidos; y

CONSIDERANDO que JANSSEN BIOTECH, INC., una sociedad del estado de Pensilvania, con domicilio de negocios en 800/850 Ridgeview Drive, Horsham, Pensilvania 19044 (de ahora en adelante denominada

"Cesionario"), está deseosa de adquirir la totalidad de los derechos, títulos e intereses de los Cedentes sobre el mismo:

AHORA, POR LO TANTO, SE HACE SABER que por la suma y en consideración de la misma por Un Dólar y otras consideraciones de valor, el recibo de las cuales es reconocido por medio del presente, los Cedentes han vendido, cedido y transferido, y por medio del presente venden, ceden y transfieren al Cesionario la totalidad del derecho, título e interés relacionado con los inventos y descubrimientos mencionados en dicha solicitud, cuya identificación por número de serie y fecha de presentación cuando sea disponible se autoriza por medio del presente y con dicha solicitud, todas las sustituciones, divisiones y continuaciones de la misma y con todos los Títulos de Patentes de los Estados Unidos de América o extranjeros que sean otorgados para dichos inventos y descubrimientos y con todas las prórrogas, renovaciones y re-expediciones de la misma, para que sean de y disfrutadas por el Cesionario, sus sucesores y asignatarios, tan amplia y cabalmente como los mismos hubieran sido de y disfrutados por los Cedentes si esta Cesión y venta no se hubieran realizado;

Y, los Cedentes por medio del presente autorizan y solicitan al Comisionado de Patentes de los Estados Unidos expedir el Título de patente de acuerdo con esta Cesión;

Y, por las consideraciones anteriores, los Cedentes pactan y acuerdan con el Cesionario que él tiene un título entero y sin cargas sobre los inventos y descubrimientos descritos atrás y aquí cedidos, cuyo título ellos garantizan al Cesionario, sus sucesores y asignatarios;

Y, por las consideraciones anteriores, los Cedentes además pactan y acuerdan que, cuando les sea solicitado y sin costo adicional para ellos, comunicarán al Cesionario o sus representantes cualquier hecho de que tengan conocimiento relacionado con dichos inventos y descubrimientos, testificarán en cualquier interferencia o procedimientos legales relacionados con dichos inventos y descubrimientos y suscribirán cualquier documento adicional que sea necesario para permitir al Cesionario o sus representantes, sucesores, nominados o asignatarios que aseguren la completa protección para los mencionados inventos o descubrimientos o que sean necesarios para conferir al Cesionario el título completo de dichos inventos y descubrimientos y las patentes transmitidos por medio del presente y para permitirle registrar dicho título.

Firmado por firma ilegible

Lynne Murray

Fecha: 5 de febrero de 2015

A S S I G N M E N T

WHEREAS, Ken Boakye, Alfred Del Vecchio, John Kehoe, Eilyn Lacy, Mary Ryan, Sandra Santulli-Marotto, John Wheeler, Brian Whitaker and Alexey Teplyakov, all with a place of business at Spring House, Pennsylvania, and Lynne Murray, with a place of business at Melbourn, United Kingdom, (hereinafter called "Assignors"), have made certain new and useful inventions or discoveries relating to

ANTI-CCL17 ANTIBODIES

for which they have executed an application for Letters Patent of the United States; and

WHEREAS, JANSSEN BIOTECH, INC., a corporation of the State of PENNSYLVANIA, having a place of business at 800/850 Ridgeview Drive, Horsham, PA 19044, (hereinafter called "Assignee"), is desirous of acquiring Assignors' entire right, title, and interest therein:

NOW, THEREFORE, BE IT KNOWN that for and in consideration of the sum of One Dollar and other valuable considerations, the receipt of which is hereby acknowledged, Assignors have sold, assigned, and transferred, and do hereby sell, assign and transfer unto said Assignee their entire right, title and interest in and to all said inventions and discoveries disclosed in said application whose identification above by serial number and filing date, when available is hereby authorized, and in and to said application, all substitutions, divisions, and continuations thereof, and in and to all Letters Patent, United States and foreign, that may be granted for said inventions and discoveries, and in and to all extensions, renewals, and reissues thereof, the same to be held and enjoyed by said Assignee, its successors and assigns, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by Assignors if this Assignment and sale had not been made;

And Assignors hereby authorize and request the Commissioner of Patents of the United States to issue said Letters Patent in accordance with this Assignment;

And for the consideration aforesaid, Assignors covenant and agree with said Assignee that he has a full and unencumbered title to the inventions and discoveries above described and hereby assigned, which title they warrant unto said Assignee, its successors and assigns;

And for the consideration aforesaid, Assignors further covenant and agree that they will, whenever requested, but without cost to them promptly communicate to said Assignee or its representatives any facts known to them relating to said inventions and discoveries, testify in any interference or legal proceedings involving said inventions and discoveries, and execute any additional papers that may be necessary to enable said Assignee or its representatives, successors, nominees, or assigns to secure full and complete protection for the said inventions and discoveries or that may be necessary to vest in said Assignee the complete title to the said inventions and discoveries and patents hereby conveyed and to enable it to record said title.

IN TESTIMONY WHEREOF, Assignor has hereunto set his hand and seal this 30th
day of April 2015

Ken Boakye (L.S.)
Ken Boakye

STATE OF Pennsylvania)
) ss.
COUNTY OF Montgomery)

BE IT REMEMBERED, That on this 30th day of April 2015,
before me, a Notary Public, personally appeared **Ken Boakye**, who I am satisfied is the person
named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having first made
known to him the contents thereof, he did acknowledge that he signed, sealed, and delivered the
same as his voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Deborah L. Pishock
Notary Public

COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA
Notarial Seal
Deborah L. Pishock, Notary Public
Douglass Twp., Montgomery County
My Commission Expires Oct. 14, 2017
MEMBER, PENNSYLVANIA ASSOCIATION OF NOTARIES

IN TESTIMONY WHEREOF, Assignor has hereunto set his hand and seal this 30th
day of April 2015

Alfred M Del Vecchio (L.S.)
Alfred Del Vecchio

STATE OF Pennsylvania)
) ss.
COUNTY OF Montgomery)

BE IT REMEMBERED, That on this 30th day of April 2015,
before me, a Notary Public, personally appeared **Alfred Del Vecchio**, who I am satisfied is the
person named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having first
made known to him the contents thereof, he did acknowledge that he signed, sealed, and
delivered the same as his voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Deborah L Pishock
Notary Public

COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA
Notarial Seal
Deborah L. Pishock, Notary Public
Douglass Twp., Montgomery County
My Commission Expires Oct. 14, 2017
MEMBER, PENNSYLVANIA ASSOCIATION OF NOTARIES

IN TESTIMONY WHEREOF, Assignor has hereunto set his hand and seal this 30th
day of April 2015

John W Kehoe (L.S.)
John Kehoe

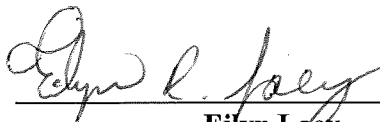
STATE OF Pennsylvania)
) ss.
COUNTY OF Montgomery)

BE IT REMEMBERED, That on this 30th day of April 2015,
before me, a Notary Public, personally appeared **John Kehoe**, who I am satisfied is the person
named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having first made
known to him the contents thereof, he did acknowledge that he signed, sealed, and delivered the
same as his voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Deborah L Pishock
Notary Public

COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA
Notarial Seal
Deborah L. Pishock, Notary Public
Douglass Twp., Montgomery County
My Commission Expires Oct. 14, 2017
MEMBER, PENNSYLVANIA ASSOCIATION OF NOTARIES

IN TESTIMONY WHEREOF, Assignor has hereunto set her hand and seal this 30th
day of April 2015

 (L.S.)
Eilyn Lacy

STATE OF Pennsylvania)
) ss.
COUNTY OF Montgomery)

BE IT REMEMBERED, That on this 30th day of April 2015,
before me, a Notary Public, personally appeared **Eilyn Lacy**, who I am satisfied is the person
named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having first made
known to her the contents thereof, she did acknowledge that she signed, sealed, and delivered
the same as her voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.



Notary Public

COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA
Notarial Seal
Deborah L. Pishock, Notary Public
Douglass Twp., Montgomery County
My Commission Expires Oct. 14, 2017
MEMBER, PENNSYLVANIA ASSOCIATION OF NOTARIES

Lynne Murray

Date

IN TESTIMONY WHEREOF, Assignor has hereunto set her hand and seal this 30th
day of April 2015

Mary Ryan (L.S.)
Mary Ryan

STATE OF Pennsylvania)
) ss.
COUNTY OF Montgomery)

BE IT REMEMBERED, That on this 30th day of April 2015,
before me, a Notary Public, personally appeared **Mary Ryan**, who I am satisfied is the person
named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having first made
known to her the contents thereof, she did acknowledge that she signed, sealed, and delivered
the same as her voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Deborah Pishock
Notary Public

COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA
Notarial Seal
Deborah L. Pishock, Notary Public
Douglass Twp., Montgomery County
My Commission Expires Oct. 14, 2017
MEMBER, PENNSYLVANIA ASSOCIATION OF NOTARIES

IN TESTIMONY WHEREOF, Assignor has hereunto set her hand and seal this 30th
day of April 2015

Sandra Santulli-Marotto (L.S.)
Sandra Santulli-Marotto

STATE OF Pennsylvania)
) ss.
COUNTY OF Montgomery)

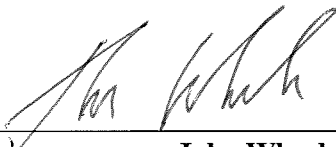
BE IT REMEMBERED, That on this 30th day of April 2015,
before me, a Notary Public, personally appeared **Sandra Santulli-Marotto**, who I am satisfied
is the person named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having
first made known to her the contents thereof, she did acknowledge that she signed, sealed, and
delivered the same as her voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Deborah L. Pishock

Notary Public

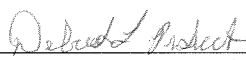
COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA
Notarial Seal
Deborah L. Pishock, Notary Public
Douglass Twp., Montgomery County
My Commission Expires Oct. 14, 2017
MEMBER, PENNSYLVANIA ASSOCIATION OF NOTARIES

IN TESTIMONY WHEREOF, Assignor has hereunto set his hand and seal this 30th
day of April 2015


_____(L.S.)
John Wheeler

STATE OF Pennsylvania)
) ss.
COUNTY OF Montgomery)

BE IT REMEMBERED, That on this 30th day of April 2015,
before me, a Notary Public, personally appeared **John Wheeler**, who I am satisfied is the person
named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having first made
known to him the contents thereof, he did acknowledge that he signed, sealed, and delivered the
same as his voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.



Notary Public

COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA
Notarial Seal
Deborah L. Pishock, Notary Public
Douglass Twp., Montgomery County
My Commission Expires Oct. 14, 2017
MEMBER, PENNSYLVANIA ASSOCIATION OF NOTARIES

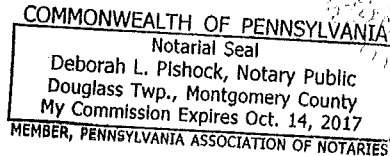
IN TESTIMONY WHEREOF, Assignor has hereunto set his hand and seal this 30th
day of April 2015

 (L.S.)
Brian Whitaker

STATE OF Pennsylvania)
) ss.
COUNTY OF Montgomery)

BE IT REMEMBERED, That on this 30th day of April 2015,
before me, a Notary Public, personally appeared **Brian Whitaker**, who I am satisfied is the
person named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having first
made known to him the contents thereof, he did acknowledge that he signed, sealed, and
delivered the same as his voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.


Notary Public



IN TESTIMONY WHEREOF, Assignor has hereunto set his hand and seal this 30th
day of April 2015

Alexey Teplyakov (L.S.)
Alexey Teplyakov

STATE OF Pennsylvania)
) ss.
COUNTY OF Montgomery)

BE IT REMEMBERED, That on this 30th day of April 2015,
before me, a Notary Public, personally appeared **Alexey Teplyakov**, who I am satisfied is the
person named in and who executed the foregoing instrument in my presence, and I having first
made known to him the contents thereof, he did acknowledge that he signed, sealed, and
delivered the same as his voluntary act and deed for the uses and purposes therein expressed.

Deborah L. Pishock
Notary Public

COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA
Notarial Seal
Deborah L. Pishock, Notary Public
Douglass Twp., Montgomery County
My Commission Expires Oct. 14, 2017
MEMBER, PENNSYLVANIA ASSOCIATION OF NOTARIES

JBI5040WOPCT

6/10

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-1-1	Declaration: Identity of the Inventor Declaration as to the identity of the inventor (Rules 4.17(i) and 51bis.1(a)(i))	In relation to this international application
	Name (LAST, First) Address	BOAKYE, Ken of 1400 McKean Road Spring House, Pennsylvania 19477 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	DEL VECCHIO, Alfred of 1400 McKean Road Spring House, Pennsylvania 19477 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	KEHOE, John of 1400 McKean Road Spring House, Pennsylvania 19477 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	LACY, Eilyn of 1400 McKean Road Spring House, Pennsylvania 19477 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
	Name (LAST, First) Address	MURRAY, Lynne of Cherry Cottage 137 High Street Melbourn Cambridgeshire SG8 6AR United Kingdom is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application

JBI5040WOPCT

7/10

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

Name (LAST, First) Address	RYAN, Mary of 1400 McKean Road Spring House, Pennsylvania 19477 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
Name (LAST, First) Address	SANTULLI-MAROTTO, Sandra of 1400 McKean Road Spring House, Pennsylvania 19477 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
Name (LAST, First) Address	WHEELER, John of 1400 McKean Road Spring House, Pennsylvania 19477 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
Name (LAST, First) Address	WHITAKER, Brian of 1400 McKean Road Spring House, Pennsylvania 19477 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application
Name (LAST, First) Address	TEPLYAKOV, Alexey of 1400 McKean Drive Spring House, Pennsylvania 19477 United States of America is the inventor of the subject matter for which protection is sought by way of this international application

JBI5040WOPCT

9/10

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-3-1	Declaration: Entitlement to claim priority Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	In relation to this international application JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled to claim priority of earlier application No. 61/900,596 by virtue of the following:
VIII-3-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, BOAKYE, Ken
VIII-3-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, DEL VECCHIO, Alfred
VIII-3-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, KEHOE, John
VIII-3-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, LACY, Eilyn
VIII-3-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, RYAN, Mary
VIII-3-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, SANTULLI-MAROTTO, Sandra
VIII-3-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, WHEELER, John
VIII-3-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, WHITAKER, Brian
VIII-3-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, TEPLYAKOV, Alexey

JBI5040WOPCT

8/10

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate. Name (LAST, First)	In relation to this international application JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, BOAKYE, Ken
VIII-2-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, DEL VECCHIO, Alfred
VIII-2-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, KEHOE, John
VIII-2-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, LACY, Eilyn
VIII-2-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, RYAN, Mary
VIII-2-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, SANTULLI-MAROTTO, Sandra
VIII-2-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, WHEELER, John
VIII-2-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, WHITAKER, Brian
VIII-2-1(i)		JANSSEN BIOTECH, INC. is entitled as employer of the inventor, TEPLYAKOV, Alexey

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 -Fax: (57 1) 6350824 -Email: info@clarkemodet.com.co

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

I (we), the undersigned MARK R WARFIELD

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

legal representative(s) of

JANSSEN BIOTECH, INC.

JANSSEN BIOTECH, INC.

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

an organization existing under the laws of

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en **800/850 Ridgeview Drive, Horsham, PA 19044, Estados Unidos de América**

and in present execution of its business activity, domiciled at **800/850 Ridgeview Drive, Horsham, PA 19044, United States of America**

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de **SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ**, con Cédula de Ciudadanía No. 22.468.787 de Barranquilla, y tp. 147463 y/o **CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO**, con Cédula de Ciudadanía No. 66.783.790 de Palmira Valle, y tp. 141563 con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to **SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ**, identification card No. 22.468.787 of Barranquilla, and tp. 147463 and/or **CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO**, identification card No. 66.783.790 of Palmira Valle, and tp. 141563 residing in Bogotá Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñanzas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella)
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

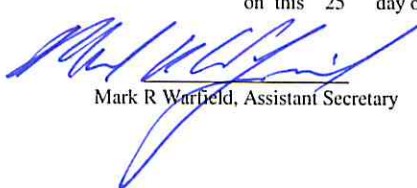
- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Dado y firmado en

Granted and signed at New Brunswick, NJ USA

a los días de

on this 25 day of February of 2015


Mark R Warfield, Assistant Secretary


AMANDA LIN HAYNES
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires 10/28/2018

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

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

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 16TH DAY OF MARCH 2015
7. BY: Andrew P Sidamon-Eristoff
State Treasurer
8. NO: A543167
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



A handwritten signature in black ink, appearing to be "A. P. Sidamon-Eristoff", is written over the signature line.

Certificate Number: 1355655810

Verify this certificate at
https://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Janssen Biotech, Inc.
Boakye, Ken
Del Vecchio, Alfred
Kehoe, John
Lacy, Eilyn
Murray, Lynne
Ryan, Mary
Santulli-Marotto, Sandra
Teplyakov, Alexey
Wheeler, John
Whitaker, Brian

<120> Anticuerpos anti-CCL17

<130> JBI5040WOPCT

<140> A asignarse

<141> 2014-11-06

<150> 61/900,596

<151> 2013-11-06

<160> 76

<170> Versión de patente 3.5

<210> 1

<211> 71

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Arg Gly Thr Asn Val Gly Arg Glu Cys Cys Leu Glu Tyr Phe Lys

1 5 10 15

Gly Ala Ile Pro Leu Arg Lys Leu Lys Thr Trp Tyr Gln Thr Ser Glu

20 25 30

Asp Cys Ser Arg Asp Ala Ile Val Phe Val Thr Val Gln Gly Arg Ala

35 40 45

Ile Cys Ser Asp Pro Asn Asn Lys Arg Val Lys Asn Ala Val Lys Tyr

50 55 60

Leu Gln Ser Leu Glu Arg Ser

65 70

<210> 2

<211> 72

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 2

Met Ala Arg Gly Thr Asn Val Gly Arg Glu Cys Cys Leu Lys Tyr Phe

1 5 10 15

Lys Gly Ala Ile Pro Leu Arg Lys Leu Lys Thr Trp Tyr Gln Thr Ser

20 25 30

Glu Asp Cys Ser Arg Asp Ala Ile Val Phe Val Thr Val Gln Asn Lys

35 40 45

Ala Ile Cys Ser Asp Pro Asn Asp Lys Lys Val Lys Lys Ala Leu Lys

50 55 60

Tyr Leu Gln Ser Leu Glu Arg Ser

65 70

<210> 3

<211> 69

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 3

Gly Pro Tyr Gly Ala Asn Met Glu Asp Ser Val Cys Cys Arg Asp Tyr

1 5 10 15

Val Arg Tyr Arg Met Pro Leu Arg Val Val Lys His Phe Tyr Trp Thr

20 25 30

Ser Asp Ser Cys Pro Arg Pro Gly Val Val Leu Leu Thr Ser Arg Asp

35 40 45

Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Arg Val Pro Trp Val Lys Met Ile Leu

50 55 60

Asn Lys Leu Ser Gln

65

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR1 de C17F24

<400> 4

Ser Tyr Trp Ile Gly

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR2 de C17F24

<400> 5

Ile Ile Asp Pro Ser Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR3 de C17F24

<400> 6

Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Asp Ser Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR1 de C17F24

<400> 7

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR1 de C17B234

<400> 8

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Ser Phe Asp Asn Ile Asn Lys Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR1 de C17B235

<400> 9

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Phe Tyr Asn Phe Asn Ala Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR1 de C17B236

<400> 10

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Ser Pro Trp Asn Ser Asn Gln Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR1 de C17B237

<400> 11

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Thr Ser Tyr Asn Asn Ser Asn Tyr Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR1 de C17B238

<400> 12

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Ile Ser Ala Phe Asn Gln Asn Pro Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR1 de C17B239

<400> 13

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Ser Ser Phe Thr Asn Thr Asn Thr Leu

1 5 10 15

Ala

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR1 de C17B240

<400> 14

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser His Val Asn Tyr Asn Ala Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR1 de C17B241

<400> 15

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser Phe Thr Asn Asn Asn Ala Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR1 de C17B242

<400> 16

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Ser His Asp Asn Leu Asn Thr Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR1 de C17B243

<400> 17

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser Phe Asp Asn Lys Asn Asp Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR1 de C17B244

<400> 18

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Ser Ser Ile Thr Asn Val Asn Asp Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR2 de C17F24

<400> 19

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1

5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR2 de C17B234

<400> 20

Asn Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR2 de C17B235

<400> 21

His Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR2 de C17B236

<400> 22

Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR2 de C17B237

<400> 23

Leu Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR2 de C17B238

<400> 24

Asp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR2 de C17B241

<400> 25

Glu Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR2 de C17B244

<400> 26

Thr Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR3 de C17F24

<400> 27

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR3 de C17B234

<400> 28

Gln Gln Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR3 de C17B235

<400> 29

Gln Gln Phe Tyr Ala Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR3 de C17B236

<400> 30

Gln Gln Tyr Tyr Leu Ile Pro Ser Thr

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR3 de C17B237

<400> 31

Gln Gln Tyr Leu Ser Pro Pro Ser Thr

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR3 de C17B238

<400> 32

Gln Gln Tyr Gln Phe Ile Pro Phe Thr

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR3 de C17B239

<400> 33

Gln Gln Tyr Leu Ile Tyr Pro Ser Thr

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR3 de C17B240

<400> 34

Gln Gln Tyr Tyr Thr Leu Pro Ala Thr

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR3 de C17B241

<400> 35

Gln Gln Thr Asn Ser Ile Pro Leu Thr

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR3 de C17B242

<400> 36

Gln Gln Tyr Tyr Ala Val Pro Gln Thr

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR3 de C17B243

<400> 37

Gln Gln His Trp Gln Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR3 de C17B244

<400> 38

Gln Gln Tyr Tyr His Asp Pro Phe Thr

1 5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR2 de C17B257

<400> 39

Ala Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR2 de C17B262

<400> 40

Ser Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> LCDR2 de C17B264

<400> 41

Ile Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1 5

<210> 42

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR3 de C17B293

<400> 42

Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Asp Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR3 de C17B294

<400> 43

Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Asp Thr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HCDR3 de C17B295

<400> 44

Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Glu Ser Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 45

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH de C17F24, C17B234, C17B235, C17B236,
C17B237, C17B238, C17B239, C17B240, C17B241,
C17B242, C17B243, C17B244, C17B257, C17B258,
C17B260, C17B262, C17B266, C17B264

<400> 45

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Asp Ser Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH de C17M293

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Asp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 47

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH de C17B294

<400> 47

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1

5

10

15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20

25

30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Asp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VH de C17B295

<400> 48

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Glu Ser Phe Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 49

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17F24

<400> 49

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20

25

30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35

40

45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65

70

75

80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85

90

95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 50

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17B234

<400> 50

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Ser

20 25 30

Phe Asp Asn Ile Asn Lys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 51

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17B235

<400> 51

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20

25

30

Phe Tyr Asn Phe Asn Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35

40

45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65

70

75

80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85

90

95

Phe Tyr Ala Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 52

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17B236

<400> 52

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Ser

20 25 30

Pro Trp Asn Ser Asn Gln Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Leu Ile Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 53

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17B237

<400> 53

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Thr Ser

20

25

30

Tyr Asn Asn Ser Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35

40

45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65

70

75

80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85

90

95

Tyr Leu Ser Pro Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 54

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17B238

<400> 54

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Ile Ser

20 25 30

Ala Phe Asn Gln Asn Pro Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Gln Phe Ile Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 55

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17B239

<400> 55

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Ser Ser

20

25

30

Phe Thr Asn Thr Asn Thr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35

40

45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65

70

75

80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85

90

95

Tyr Leu Ile Tyr Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 56

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17B240

<400> 56

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

His Val Asn Tyr Asn Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asn Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Thr Leu Pro Ala Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 57

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17B241

<400> 57

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser

20

25

30

Phe Thr Asn Asn Asn Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35

40

45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65

70

75

80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85

90

95

Thr Asn Ser Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 58

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17B242

<400> 58

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Phe Ser

20 25 30

His Asp Asn Leu Asn Thr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr His Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Ala Val Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 59

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17B243

<400> 59

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Asn Ser

20

25

30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

His Trp Gln Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 60

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17B244

<400> 60

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Ser Ser

20 25 30

Ile Thr Asn Val Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr His Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 61

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17B257

<400> 61

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Ser

20

25

30

Phe Asp Asn Ile Asn Lys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35

40

45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65

70

75

80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85

90

95

Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 62

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17B258

<400> 62

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Ser

20 25 30

Phe Asp Asn Ile Asn Lys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 63

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17B260

<400> 63

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Ser

20

25

30

Phe Asp Asn Ile Asn Lys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35

40

45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65

70

75

80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85

90

95

Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 64

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17B262

<400> 64

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Ser

20 25 30

Phe Asp Asn Ile Asn Lys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 65

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17B263

<400> 65

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Ser

20

25

30

Phe Asp Asn Ile Asn Lys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35

40

45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65

70

75

80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85

90

95

Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 66

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL de C17B264

<400> 66

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Ser

20 25 30

Phe Asp Asn Ile Asn Lys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ile Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys

<210> 67

<211> 447

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CB302 HC

<400> 67

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1

5

10

15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20

25

30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Asp Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
385 390 395 400

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 68

<211> 220

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CB302 LC

<400> 68

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Ser

20 25 30

Phe Asp Asn Ile Asn Lys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

115

120

125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

130

135

140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145

150

155

160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

165

170

175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

180

185

190

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

195

200

205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

220

<210> 69

<211> 447

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CB301 HC

<400> 69

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1

5

10

15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20

25

30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

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

50

55

60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Asp Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
130 135 140

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

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

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

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

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Ala Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
385 390 395 400

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 70

<211> 220

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CB301 LC

<400> 70

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

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

Phe Asp Asn Ile Asn Lys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35

40

45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65

70

75

80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85

90

95

Phe Tyr Ser Val Pro Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100

105

110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

115

120

125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

130

135

140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu

145

150

155

160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp

165

170

175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

180

185

190

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

195

200

205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

215

220

<210> 71

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso de HCDR3

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa puede ser Ser, Ala o Thr

<400> 71

Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Asp Xaa Phe Asp Tyr

1

5

10

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso de LCDR1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa puede ser Leu, Tyr, Ser o Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa puede ser Phe, Pro, His o Ile

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa puede ser Asp, Tyr, Trp, Thr o Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa puede ser Ile, Phe, Ser, Thr, Tyr, Asn, Lys o Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa puede ser Lys, Ala, Qln, Thr o Asp

<400> 72

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Xaa Ser Xaa Xaa Asn Xaa Asn Xaa Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 73

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de consenso de LCDR2

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa puede ser Asn, His, Gly, Glu, Thr o Asp

<400> 73

Xaa Ala Ser Thr Arg Glu

1

5

<210> 74

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso de LCDR3

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser Phe, Tyr, Thr o His

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser Tyr, Leu, Asn o Trp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser Ser, Ala, Leu, Ile, Thr, Qln o His

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser Val, Thr, Ile, Tyr, Leu o Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa puede ser Ser, Phe, Ala o Leu

<400> 74

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr

1 5

<210> 75

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de consenso de VH

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (107)..(107)

<223> Xaa puede ser Ser, Ala o Thr

<400> 75

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35

40

45

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

50

55

60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Val Gly Pro Ala Asp Val Trp Asp Xaa Phe Asp Tyr Trp Gly

100

105

110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 76

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de consenso de VL

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (31)..(31)

<223> Xaa puede ser Leu, Tyr, Ser o Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (33)..(33)

<223> Xaa puede ser Phe,Pro, His o Ile

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (34)..(34)

<223> Xaa puede ser Asp, Tyr, Trp, Thr o Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(36)

<223> Xaa puede ser Ile, Phe, Ser, Thr, Tyr, Asn, Lys o Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (38)..(38)

<223> Xaa puede ser Lys, Ala, Qln, Thr o Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (56)..(56)

<223> Xaa puede ser Asn, His, Gly, Glu, Thr o Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (97)..(97)

<223> Xaa puede ser Phe, Tyr, Thr o His

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (98)..(98)

<223> Xaa puede ser Tyr, Leu, Asn o Trp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (99)..(99)

<223> Xaa puede ser Ser, Ala, Leu, Ile, Thr, Qln o His

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (100)..(100)

<223> Xaa puede ser Val, Thr, Ile, Tyr, Leu o Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (102)..(102)

<223> Xaa puede ser Ser, Phe, Ala o Leu

<400> 76

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Xaa Ser

20 25 30

Xaa Xaa Asn Xaa Asn Xaa Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

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

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

Lys

Resumen

La presente invención se refiere a los antagonistas que se unen específicamente a CCL17, los polinucleótidos que codifican para los anticuerpos o fragmentos, y los métodos de preparación y sus usos.

Se reivindica:

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a CCL17 humana, en donde comprende una región variable de cadena pesada (VH, por sus siglas en inglés) y una región variable de cadena ligera (VL, por sus siglas en inglés), en donde el anticuerpo compete para unirse a la CCL17 humana con un anticuerpo que comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 45 y la VL de identificación de secuencia núm.: 52.
2. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une a la CCL17 humana al menos dentro de los residuos de aminoácidos de CCL17 21-23, 44- 45 y 60-68 de identificación de secuencia núm.: 1.
3. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2 en donde el anticuerpo se une a la CCL17 humana en al menos los residuos R22 y K23 de identificación de secuencia núm.: 1.
4. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo bloquea la interacción CCL17/CCR4.
5. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 4, en donde el anticuerpo se une a CCL17 humana con una constante de afinidad (k_D) de aproximadamente 1×10^{-10} M o inferior, cuando la k_D se mide mediante el uso de afinidad de equilibrio de solución reguladora salina basada en tris que contiene 0,05 % de Tween-20 después de la co-incubación del anticuerpo y CCL17 humana durante 48 horas a 4 °C.

6. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo se une a la CCL17 humana con la K_D de aproximadamente 5×10^{-12} M o inferior.
7. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-6, en donde el anticuerpo se une a CCL17 de *Macaca fascicularis* (cyno) con la K_D de aproximadamente 1×10^{-8} M o inferior, cuando la K_D se mide mediante el uso de afinidad de equilibrio de solución reguladora salina basada en tris que contiene 0,05 % de Tween-20 después de co-incubación del anticuerpo y CCL17 de cyno durante 48 horas a 4 °C.
8. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo inhibe 10 ng/ml de movilización de calcio inducida por CCL17 humana en células CCRF- CEM medida mediante el uso de Fluo-8 NW con un valor de IC_{50} de aproximadamente 1×10^{-9} M o inferior.
9. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 5, en donde comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR, por sus siglas en inglés) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) y 3 (HCDR3) y regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR, por sus siglas en inglés) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) y 3 (LCDR3), en donde la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 4, 5, 42, 8, 24 and 28, respectivamente, o la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 46 y 62, respectivamente.

10. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-8, en donde comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada(HCDR, por sus siglas en inglés) 1 (HCDR1), 2 (HCDR2) y 3 (HCDR3) y regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR, por sus siglas en inglés) 1 (LCDR1), 2 (LCDR2) y 3 (LCDR3), en donde la HCDR1, la HCDR2, la HCDR3, la LCDR1, la LCDR2 y la LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 4, 5, 71, 72, 73 y 74, respectivamente.
11. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 10, en donde HCDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 4, la HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 5 y la HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 6, 42 o 43.
12. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 11, en donde LCDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 8, 9, 10, 13, 14, 15, 17 o 18, la LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 20, 21, 22, 24, 25 y 26 y la LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 28, 29, 30, 33, 34, 35, 37 o 38.
13. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 12, en donde comprende las secuencias HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de
- a) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 8, 20 y 28, respectivamente;
 - b) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 9, 21 y 29, respectivamente;

- c) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 10, 22 y 30, respectivamente;
- d) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 13, 21 y 33, respectivamente;
- e) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 14, 20 y 34, respectivamente;
- f) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 15, 25 y 35, respectivamente;
- 5 g) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 17, 25 y 37, respectivamente;
- h) sec. con núm. de ident.: 4, 5, 6, 18, 26 y 38, respectivamente;
- i) identificación de secuencia núm.: 4, 5, 42, 8, 24 y 28, respectivamente; o
- j) identificación de secuencia núm.: 4, 5, 43, 8, 24 y 28, respectivamente.

14. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 10, en donde el

10 anticuerpo comprende la VH de identificación de secuencia núm.: 75 y la VL de identificación de secuencia núm.: 76.

15. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 14, en donde VH comprende una secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 45, 46 o 47.

15 16. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 15, en donde VL comprende una secuencia de aminoácidos de identificación de secuencia núm.: 50, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60 o 62.

17. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 16, en donde el anticuerpo comprende:

- 20 a) la VH de identificación de secuencia núm.: 45 y la VL de identificación de secuencia núm.: 50, 51, 52, 55, 56, 57, 59 o 60;
- b) la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 46 y 62, respectivamente; o

c) la VH y la VL de identificación de secuencia núm.: 47 y 62, respectivamente.

18. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo comprende la VH que comprende la secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la VH de identificación de secuencia núm.: 46 y la VL que comprende la secuencia de aminoácidos al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la VL de identificación de secuencia núm.: 62.

19. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-18, en donde el anticuerpo es humano o está humanizado.

20. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 19, en donde el anticuerpo es el isotipo de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

21. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 20, en donde el anticuerpo comprende una sustitución en la región Fc.

22. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 21, en donde la sustitución comprende sustitución de V234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S o P331S en IgG2, o sustitución de S228P, L234A o L235A en IgG4, en donde la numeración de residuos es de conformidad con el índice EU.

23. El anticuerpo de conformidad con la reivindicación 22, en donde la sustitución comprende sustitución de V234A/ G237A/ P238S/ H268A/ V309L/ A330S/P331S en IgG2, o sustitución de S228P/ L234A/L235A en

IgG4, en donde la numeración de residuos es de conformidad con el índice EU.

24. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-23, y un portador farmacéuticamente aceptable.

5 25. Un polinucleótido aislado que codifica la VH o la VL del anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 9-24.

26. Un vector que comprende el polinucleótido de conformidad con la reivindicación 25.

10 27. Una célula huésped aislada que comprende el vector de conformidad con la reivindicación 26.

28. Un método para producir un anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 9-24, el método comprende cultivar la célula huésped de conformidad con la reivindicación 27, en condiciones en las que se produce el anticuerpo.

15 29. Un método para tratar una enfermedad mediada por CCL17, el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite el anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-24, durante un tiempo suficiente para tratar la enfermedad mediada por CCL17.

20 30. El método de conformidad con la reivindicación 29, en donde la enfermedad mediada por CCL17 es una enfermedad inflamatoria.

31. El método de conformidad con la reivindicación 30 en donde la enfermedad es asma, colitis ulcerativa (UC, por sus siglas en inglés), dermatitis atópica (AD, por sus siglas en inglés) o fibrosis pulmonar idiopática (IPF).

32. Un método para tratar el asma o la hiper-reactividad de las vías aéreas; el método comprende administrar a un sujeto que lo necesite un anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-24, durante un tiempo suficiente para tratar el asma.
- 5 33. Uso del anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-24, para tratamiento.
34. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-24, para usar en tratamiento.
35. El anticuerpo de conformidad con las reivindicaciones 1-24, para usar en el
- 10 tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad mediada por CCL17.
36. El anticuerpo para utilizar de conformidad con la reivindicación 35, en donde la enfermedad mediada por CCL17 es una enfermedad inflamatoria, asma, colitis ulcerativa (UC), dermatitis atópica (AD) o fibrosis pulmonar idiopática (IPF).
- 15 37. El anticuerpo para usar de conformidad con la reivindicación 36, en donde la enfermedad mediada por CCL17 es asma.