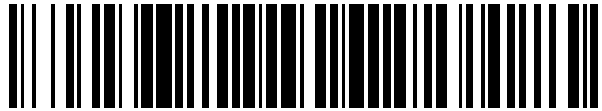


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 475**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2007 E 07748263 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 2041176**

54 Título: **Moléculas de anticuerpos para IL-17 humana**

30 Prioridad:

23.06.2006 US 815828 P
24.04.2007 US 913566 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2013

73 Titular/es:

MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)
Milstein Building Granta Park
Cambridge CB21 6GH, GB

72 Inventor/es:

COCHRANE, DUNCAN;
DUFNER, PATRICK;
LANGHAM, CAROLINE;
NEEDHAM, MAURICE;
RUSSELL, CAROLINE;
SLEEMAN, MATTHEW y
WELSH, FRASER

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 399 475 T3

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

DESCRIPCIÓN

Moléculas de anticuerpos para la IL-17 humana.

5 Esta invención se relaciona con miembros de unión para la interleucina 17 (IL-17, además conocida como IL-17A), especialmente moléculas de anticuerpos, y su uso terapéutico por ejemplo en el tratamiento de trastornos asociados con la IL-17 tal como la artritis reumatoide.

10 La IL-17A es una citocina derivada de las células-T, la cual tiene actividades pro-inflamatorias pleiotrópicas. *In vitro*, la IL-17A regula la producción de mediadores inflamatorios de fibroblastos y sinoviocitos, puede sinergizar con otras citocinas pro-inflamatorias, y puede promover la degradación del cartílago y la resorción osteoclástica del hueso.

15 La IL-17A es un homodímero que consiste de dos cadenas de 155 aminoácidos. Cada cadena polipeptídica incluye un péptido N-terminal de 23 aminoácidos el cual se escinde para producir un polipéptido maduro de 132 residuos. La IL-17A se une a y ejerce su efecto a través de la activación de los receptores A y C de la IL-17 (Toy y otros 2006). Existen cinco homólogos de la IL-17A, designados IL-17B a IL-17F, todos con papeles biológicos divergentes y distintos. Los números de acceso del Swissprot para los homólogos de la IL-17 son: IL-17B Q9UHF5; IL-17C Q96POM4; IL-17D Q8TAD2; IL-17E Q9H293; IL-17F Q96PD4. La IL-17B y la IL-17C tienen una amplia expresión en los tejidos con el origen celular de las proteínas desconocido, aunque se pueden encontrar transcritos de IL-17B a altos niveles en el sistema nervioso (Moore y otros 2002). La IL-17B y la IL-17C pueden inducir TNF α a partir de la línea celular de monocitos THP-1 (Li y otros 2000), e inducir neutrofilia cuando se inyectan en modelos de ratón (Shi y otros 2000). La IL-17D se detecta en múltiples tejidos y se expresa en células T CD4+ en reposo y en células B CD19+ (Starnes y otros 2002). La IL-17E (IL-25) produce respuestas de tipo Th2 tales como hiperreactividad de las vías respiratorias y eosinofilia y tiene propiedades distintas a los otros miembros de la familia (Fort y otros 2001). La IL-17F existe como dos isoformas y exhibe la mayor homología con la IL-17A (55 y 40% de homología) y comparte muchas propiedades funcionales similares tales como la inducción de neutrofilia en el pulmón y la inducción de citocinas pro-inflamatorias que incluyen IL-8 (Hymowitz y otros 2001; Hurst y otros 2002, Oda y otros. 2005). Los miembros de la familia de la IL-17 pueden tener un papel en la inmunidad innata y adaptativa por lo tanto un anticuerpo dirigido solamente a la IL-17A asegurará que los efectos específicos de la señalización de la IL-17A se supriman en áreas donde se expresa la IL-17A.

30 La unión entre los miembros de la familia y la familia del receptor de la IL-17 no se comprenden totalmente. Se conoce que la IL-17E señala a través del IL-17RB aunque la IL-17B también se informó que se une con una afinidad más baja. (Lee y otros 2001). La IL-17A se informó que se une al IL-17RC (IL-17RL) adicionalmente al IL-17RA y similarmente a la IL-17F comparte la unión a estos receptores (Toy y otros 2006, Kuestner y otros. 2005). Existen receptores adicionales, IL-17RD y IL-17RE aunque sus ligandos endógenos todavía tienen que identificarse. Existen múltiples variantes de empalme para la IL-17RC y la IL-17RD (Haudenschild y otros. 2002; Haudenschild y otros. 2006; Moseley y otros. 2003).

40 La unión de la IL-17A a su receptor es probable que induzca polimerización del receptor lo que resulta en su activación. La activación del IL-17RA por la IL-17A activa un número de rutas de señalización pro-inflamatorias tales como las rutas de la proteína quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1/2), la quinasa terminal c-jun (JNK) y la quinasa MAP p38. La activación de estas rutas desencadena cambios en los niveles de expresión de una variedad de genes y proteínas, a través de mecanismos que no están completamente definidos.

45 La IL-17A se secreta primariamente por las células T CD4+ y T CD8+ (Lubberts y otros. 2001). La IL-17A, como su ARN o proteína intracelular, además se detectó en neutrófilos, eosinófilos y monocitos de sangre humana. (Molet y otros. 2001; Ferretti y otros. 2003). La IL-6 y el TGF β se implicaron recientemente en la diferenciación de células T vírgenes en células T productoras de IL-17 (Betteli y otros. 2006), mientras dos citocinas adicionales implicadas en la artritis reumatoide, la IL-15 y la IL-23, regulan la liberación de la IL-17A de los linfocitos T.

50 La IL-17A regula ascendentemente la producción de citocinas inflamatorias y la producción de prostaglandinas de los fibroblastos sinoviales, aumenta la producción de MMP de los fibroblastos sinoviales y los condrocitos articulares y puede jugar un papel en la resorción osteoclásticas de los huesos. En el contexto del entorno inflamatorio en el tejido de la artritis reumatoide (RA), la IL-17A puede tener un papel particular al sinergizar con otras citocinas pro-inflamatoria notablemente el TNF- α y la IL-1 β .

55 Varias líneas de evidencia sugieren un importante papel para la IL-17 en la patogénesis de la artritis reumatoide (RA). La IL-17A funcional se secretó espontáneamente por 16/18 explantes sinoviales de RA en comparación a 2/12 explantes OA y 0/3 explantes sinoviales normales. La inmunotinción del sinovio de RA reveló células productoras de IL-17A en el área rica en células T (Chabaud y otros. 1999). El nivel de IL-17A en el suero de pacientes de RA es elevado en comparación con sueros controles normales (Cho y otros. 2004).

60

Se mostró que la IL-17A estimula la liberación de una variedad de citocinas pro-inflamatorias. La IL-17A, algunas veces al actuar en sinergia con otras citocinas, aumenta la producción de IL-1, IL-6, y LIF de fibroblastos sinoviales. (Katz y otros. 2001; Chabaud y otros. 1998). Además, se mostró que la IL-17A regula ascendentemente la expresión de COX-2 en células inflamatorias.

La IL-17A induce la expresión del gen COX-2 en condrocitos, fibroblastos sinoviales y macrófagos humanos y en explantes sinoviales humanos. (por ejemplo Faour y otros. 2003; Le Grand y otros. 2001). La IL-17A recombinante regula ascendentemente la expresión de COX-2 por los sinoviocitos y aumenta la expresión de COX-2 por los sinoviocitos estimulada por TNF α (Stamp y otros., 2004).

Adicionalmente a estas actividades pro-inflamatorias "clásicas", la IL-17A además produce otros efectos en las articulaciones de RA tales como promover la degradación del cartílago. Se mostró además que la IL-17 participa en la regulación ascendente de MMPs e impacta en la degradación del cartílago. La IL-17A aumenta la producción espontánea de MMP1 por los sinoviocitos de RA humana. La IL-17A coordinadamente regula ascendentemente los genes de MMP3, MMP13 y ADAMTS4 en condrocitos articulares bovinos (Sylvester y otros. 2004). La IL-17A es un potente inductor de la descomposición de la matriz y un inhibidor de la síntesis de la matriz en explantes de cartílago articular (Cai y otros 2001). Un mecanismo por el cual la IL-17A suprime la síntesis de la matriz por condrocitos articulares es a través del aumento de la producción de NO (Lubbets y otros. 2000). La IL-17A adenoviral inyectada en la articulación de la rodilla de ratones inmunizados con colágeno de tipo II acelera la aparición, agrava la inflamación sinovial y aumenta la destrucción de la articulación en este sitio. (Lubbets y otros. 2001). La IL-17A puede además participar en la resorción osteoclástica de los huesos en R.A. (Kotake y otros. 1999).

Un aspecto importante de la biología de la IL-17A es su habilidad para sinergizar con otras citocinas. Por ejemplo, la IL-17A aumenta la síntesis de IL-1, IL-6 e IL-8 inducida por TNF- α en fibroblastos sinoviales (Katz y otros. 2001). Además, en la línea celular osteoblástica, MC-3T3, la IL-17 y el TNF- α exhiben una potente sinergia al mediar la secreción de IL-6 (Ruddy y otros. 2004). La IL-17A aumenta la producción de IL-6 y LIF inducida por IL-1 β por los sinoviocitos de RA (Chabaud y otros. 1998).

El papel de la IL-17A en RA se confirma más aun por evidencias *in vivo* a partir de modelos animales de la enfermedad. La sobre-expresión de IL-17A induce daño en el cartílago en la artritis inducida por la pared celular de estreptococo (SCW) en ratones deficientes en IL-1 (Koenders y otros. 2005b). En el modelo de la artritis inducida por colágeno (CIA), la sobre-expresión de IL-17A aumenta la artritis (Chabaud & Miossec 2001). Además, la CIA se suprime en ratones deficientes de IL-17A o en ratones tratados con un Acm anti-IL-17 (Nakae y otros. 2003; Lubbets y otros. 2001; Lubbets y otros 2004).

Adicionalmente a su papel en RA, la actividad de la IL-17A se asoció con un número de otras patologías que incluyen:

- osteoartritis (por ejemplo, Honorati y otros 2002); Malemud y otros. 2004);
- pérdida ósea (Lubbets y otros. 2003) y el aflojamiento de los implantes de huesos (Van Bezooijen y otros. 1999);
- la hipersensibilidad de las vías respiratorias lo que incluye enfermedad alérgica de las vías respiratorias tal como el asma (Molet y otros 2001; Wong y otros. 2001; Linden 2006) y ARDS;
- trastornos demielinizantes que incluyen la esclerosis múltiple (Lock y otros. 2002; Touil y otros. 2006);
- soriasis (Teunissen y otros. 1998) y la artritis soriásica;
- la hipersensibilidad dérmica que incluye la dermatitis atópica (Toda y otros. 2003);
- el rechazo agudo de trasplante (Antonysamy y otros. 1999; Yoshida y otros. 2006; Tang y otros 2001);
- rechazo a aloinjerto (Hsieh y otros 2001);
- enfermedad del injerto contra el huésped;
- esclerosis sistémica (Kurasawa y otros 2000);
- lupus eritematoso sistémico (Wong y otros. 2000);
- las enfermedades autoinmunes inflamatorias del intestino que incluyen la colitis ulcerativa (Nielsen y otros. 2003; Fujino y otros. 2003; Yen y otros. 2006) y enfermedad de Crohn;
- los trastornos inflamatorios urológicos que incluyen la hiperplasia benigna de próstata (Kramer & Marberger 2006);
- la enfermedad cardiovascular que incluye la aterosclerosis (Csiszar & Ungvari 2004), la enfermedad de Kawasaki (Sohn y otros. 2003), la enfermedad isquémica del corazón (Csiszar 2003) y el infarto;
- vasculitis que incluye la enfermedad de Behcet (Hamzaoui y otros. 2002);
- fiebres periódicas que incluyen la fiebre Mediterránea familiar (Haznedaroglu y otros. 2005);
- el metabolismo de la glucosa que incluye la diabetes tipo 1 y tipo 2 (Fisman 2003);

- enfermedades pulmonares que incluyen la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Shen y *otros*. 2004a; Shen y *otros*. 2004b), bronquitis, enfisema, síndrome de la bronquiolitis obliterante (Vanaudenaerde y *otros*. 2003) y la fibrosis pulmonar;
- cáncer que incluye el linfoma (Maggio y *otros*. 2002) y tumores (Numasaki y *otros*. 2005);
- peridontitis (Vernal y *otros*. 2005; Takahashi 2005);
- enfermedades causadas por infecciones virales que incluyen la queratitis estromal herpética (Maertzdorf y *otros*. 2002);
- otros trastornos inflamatorios mediados por la IL-17 incluyen por ejemplo alergias, artritis reactiva, dolor inflamatorio, espondiloartropatías que incluyen la espondilitis anquilosante, enfermedades inflamatorias de la piel y la córnea, trastornos inflamatorios de los músculos;
- otras reacciones inflamatorias agudas mediadas por la IL-17 tales como las infecciones incluyen la septicemia, choque séptico y endotóxico, meningitis y trauma (cirugía);
- otros trastornos autoinmunes mediados por la IL-17 incluyen por ejemplo trastornos hematológicos autoinmunes, Alzheimer, sarcoidosis, cirrosis, enfermedades de la vesícula biliar y el hígado que incluyen hepatitis, glomerulonefritis;
- otros trastornos metabólicos mediados por la IL-17 que incluyen por ejemplo dislipidemia.

El bloqueo de la IL-17A *in vivo* suprime la inflamación, la destrucción de las articulaciones y la progresión de la enfermedad en un número de modelos de artritis. El uso de proteínas de fusión IL-17R Fc demostró la supresión del daño a la articulación a nivel macroscópico en CIA murina (Lubberts y *otros* 2001) y además por análisis histológicos en modelos de artritis de artritis inducida por adyuvante (AIA) en ratas (Bush y *otros*.2002). El uso de anticuerpos comerciales neutralizantes para la IL-17 (de rata anti-ratón) y el IL-17R (de rata anti-ratón) demostraron inhibición de la inflamación y de la aparición de la artritis en un modelo infeccioso de artritis (Burchill y *otros*. 2003). Anticuerpos policlonales de conejo anti-ratón se usaron en modelos murinos de artritis y demostraron disminución en la severidad del daño a la articulación y destrucción del cartílago y reducción en los niveles de mediadores pro-inflamatorios que incluyen RANKL, IL-1 β e IL-6 (Lubberts y *otros*. 2004; Koenders y *otros*. 2005a).

La neutralización de la IL-17 demostró efectos funcionales en otros modelos animales de una variedad de enfermedades. La proteína de fusión IL-17R Fc extendió la sobrevida en un modelo de aloinjerto de ratón. (Antonysamy y *otros*. 1999). La proteína de fusión IL-17R IgG además atenuó la inflamación colónica en un modelo de ratón de colitis inducida por ácido sulfónico trinitrobenzeno (TNBS) (Zhang y *otros*. 2006). El IL-17 anti-monoclonal comercial demostró eficacia en un modelo de asma en ratón al reducir la neutrofilia bronquial tras un reto con Ova (Hellings y *otros*. 2003). Anticuerpos policlonales de conejo neutralizantes de IL-17 redujeron además la adhesiogénesis en un modelo de rata de adhesión quirúrgica en forma dependiente de la dosis (Chung y *otros*. 2002).

Se describieron anticuerpos para la IL-17A. Por ejemplo, se produjo el anticuerpo monoclonal murino anti-IL-17 MAB317 por R&D Systems. Este anticuerpo IgG2B se desarrolló a partir de un hibridoma de ratón que se produjo de un ratón inmunizado con IL-17 humana recombinante purificada (derivada de *E. Coli*). Además se desarrolló un anticuerpo murino anti-IL17 adicional 53.159.16 (Biosource Inc.) el cual tiene propiedades neutralizantes. Este anticuerpo IgG1K se desarrolló a partir de un hibridoma de ratón producido de un ratón (Balb/c) que se inmunizó con IL-17 humana recombinante purificada. Este anticuerpo reconoce la IL-17 humana natural y recombinante.

El documento WO2006/05405 (UCB CellTech) describe una molécula de anticuerpo neutralizante para IL-17A. Se describe un fragmento de anticuerpo pegilado, el cual se derivó de una versión de línea germinal de un anticuerpo anti-IL17 originalmente aislado de un hibridoma. El documento indica que por medio del uso del BIAcore se determinó que el fragmento de anticuerpo tenía una afinidad por la IL-17 en el intervalo de 133-365 pM.

El documento WO2006/013107 (Novartis Pharma GmbH) describe miembros de unión para la IL-17A, en particular un anticuerpo IgG1 anti-IL-17 humano designado AIN457, el cual se aisló de un hibridoma. El WO2006/01310 informa la medición de afinidad por BIAcore (Kd) para la interacción entre AIN457 recombinante y la IL-17 de hombre (0.227 nM), tití (1.2 nM), mono rhesus (9 nM) y mono cinomolgo (6 nM), lo que indica aproximadamente una diferencia de 25-veces en la afinidad por la IL-17 humana y de cinomolgo respectivamente.

Los miembros de unión para la IL-17A, se conocen también como miembros de unión a IL-17A, se describen en la presente descripción. Miembros de unión de la invención pueden ser moléculas de anticuerpo, especialmente moléculas de anticuerpos humanos, para la IL-17A.

Los miembros de unión son útiles para tratar trastornos asociados con la IL-17A, por ejemplo uno o más de los trastornos

relacionados con la IL-17 a los que se hace referencia en otro lugar en la presente descripción, tal como la artritis reumatoide.

5 Se describen en la presente descripción miembros de unión que se unen en la región de las posiciones 71-87 de la IL-17A humana madura. Las posiciones 71-87 tienen la secuencia Cys-Arg-His-Leu-Gly-Cys-Ile-Asn-Ala-Asp-Gly-Asn-Val-Asp-Tyr-His-Met (sec. con núm. de ident.: 199).

10 Un miembro de unión de la invención puede unir al menos un residuo de Cys-Arg-His-Leu-Gly-Cys-Ile-Asn-Ala-Asp-Gly-Asn-Val-Asp-Tyr-His-Met (sec. con núm. de ident.: 199). El puede por ejemplo unir uno, dos, tres, cuatro, cinco o más de cinco residuos de sec. con núm. de ident.: 199.

15 Un miembro de unión de la invención puede unir IL-17A humana madura (sec. con núm. de ident.: 198) en los residuos Leu74, Tyr85, His86 y/o Met 87. Por ejemplo puede unir Leu74, Tyr85 y/o His86. El miembro de unión puede unir todos estos residuos. La unión se puede determinar por ejemplo al detectar u observar interacciones específicas entre el miembro de unión y los residuos de la IL-17A, por ejemplo en una estructura del complejo miembro de unión:IL-17A la cual se puede determinar por ejemplo por medio del uso de cristalografía de rayos X. Una estructura del anticuerpo 7 unida a la IL-17A humana determinada por medio del uso de cristalografía de rayos X indicó que el Anticuerpo 7 une los residuos 74 (Leu), 85 (Tyr), 86 (His) y 87 (Met) de la secuencia madura (sec. con núm. de ident.: 198).

20 Opcionalmente un miembro de unión puede unir residuos flanqueantes o residuos estructuralmente cercanos en la molécula de IL-17A, adicionalmente a unir uno o más residuos en la sec. con núm. de ident.: 199. Por ejemplo un miembro de unión puede unir Asn88.

25 Un miembro de unión de la invención puede unir IL-17A humana madura (sec. con núm. de ident.: 198) en uno o más, por ejemplo cinco o más, por ejemplo diez o más, por ejemplo todos, de los siguientes residuos:

30 Ser40
Ser41
Asp42
Tyr43
Arg46
Leu74
Tyr85
His86
Met87
35 Asn88
Pro126
Ile127.

40 Un miembro de unión de la invención puede unir la IL-17A humana madura en el residuo Ser40, Ser41, Asp42, Tyr43 y/o Arg46.

Un miembro de unión de la invención puede unir IL-17A humana madura en el residuo Tyr85, His86, Met87 y/o Asn88.

45 Un miembro de unión puede unir IL-17A humana madura en Pro126 y/o Ile127.

Como se señala en otra parte en la presente descripción, la IL-17A forma un dímero de dos cadenas de polipéptidos. Un miembro de unión o un dominio VH de la invención puede unir cada uno de dos polipéptidos de IL-17A madura en un dímero.

50 Por ejemplo, el miembro de unión puede unir un polipéptido de IL-17A del dímero en Tyr85, His86, Met87 y/o Asn88, y/o puede unir el mismo polipéptido en Pro126 y/o Ile127, y/o puede unir el otro polipéptido IL-17A del dímero en Ser40, Ser41, Asp42, Tyr43 y/o Arg46.

55 Se puede usar cualquier método adecuado de cristalografía para determinar la secuencia de los residuos unidos por un miembro de unión, por ejemplo intercambio hidrógeno-deuterio, mutagénesis dirigida, espectrometría de masa, NMR y cristalografía de rayos X.

60 El uso de la cristalografía de rayos X para determinar la estructura 3-dimensional de las proteínas a resolución atómica se conoce bien por aquellos en la materia y se usa para visualizar en detalles las partes de las proteínas que interactúan con

los anticuerpos (Padavattan y otros, 2007; Karpusas y otros, 2001). Una vez que se obtienen los cristales del miembro de unión en complejo con el antígeno objetivo, ellos se irradian con rayos-X para dar un patrón de difracción, el cual depende de la distribución atómica exacta. El patrón de difracción se puede analizar por los cristalógrafos para determinar las coordenadas de posición tridimensional de cada átomo en la estructura. Esto permite una inspección detallada de los sitios de interacción entre el miembro de unión y la IL-17A.

Así, los residuos de la IL-17A unidos por un miembro de unión se pueden determinar al observar las interacciones entre el miembro de unión y los residuos de IL-17A en una estructura en cristal de rayos X del miembro de unión unido a la IL-17A. La unión puede comprender por ejemplo enlaces de hidrógeno y/o interacciones no-polares (hidrofóbicas). Una distancia de corte de 3.2 Å se puede usar para determinar los enlaces de hidrógeno, y una distancia de corte de 4.0 Å se puede usar para determinar las interacciones no-polares. Un ejemplo de una determinación de estructura en cristal de rayos X y la identificación de residuos unidos se presenta en el Ejemplo 7.4 en la presente descripción.

El intercambio de hidrógeno péptido amida es una metodología muy bien descrita que se usa para estudiar proteínas (Englander y otros 1994). Más recientemente esto se desarrolló adicionalmente para usar proteínas etiquetadas con deuterio que pueden intercambiar protones y se acopló a la espectrometría de masa para medir las velocidades de intercambio a través de toda la proteína (Pantazatos y otros 2004). Esta velocidad de intercambio hidrógeno/deuterio (intercambio H/D) se puede modificar significativamente por la accesibilidad al solvente de modo que cuando una parte de la proteína se involucra en la unión a otra molécula la velocidad de intercambio disminuirá significativamente. Este enfoque se usa para mapear las regiones de una proteína involucradas en la interacción con anticuerpos (Lu y otros 2005), y se usó para investigar las regiones de la IL-17A involucradas en la unión a anticuerpos de la invención, como se detalla en el Ejemplo 7.1 en la presente descripción. La espectrometría de masa se usó en conjunto con el intercambio H/D, para identificar regiones de la IL-17A en contacto con un miembro de unión. Se puede demostrar, por ejemplo, que el intercambio H/D para los residuos en la sec. con núm. de ident.: 199 se ralentiza significativamente cuando la IL-17A se une a un miembro de unión de la invención.

La mutagénesis de aminoácidos únicos y regiones de proteínas con el objetivo de correlacionar la estructura con la actividad se conoce bien por los expertos en la materia y se usa para identificar regiones de proteínas que se unen a anticuerpos (Lu y otros 2005). Ejemplos del uso de estas técnicas para miembros de unión de la invención se muestran en el ejemplo 7.2.

La unión a y/o la neutralización de la IL-17A humana mutante que tiene la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.: 201 se puede usar para ensayar si un miembro de unión se une en la región de las posiciones 71-87 de la IL-17A humana madura. La ausencia de unión o neutralización, o una unión o neutralización significativamente disminuida, con la IL-17A mutante en comparación con la silvestre indica que un miembro de unión une al menos un residuo de la sec. con núm. de ident.: 199.

Un miembro de unión de la invención puede opcionalmente no unir y/o neutralizar a la IL-17A humana mutante que tiene la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.: 201. Por ejemplo, un miembro de unión de la invención puede no inhibir la unión de la IL-17A humana mutante sec. con núm. de ident.: 201 a su receptor. La neutralización de la IL-17A se puede determinar por una variedad de ensayos, ejemplos de los cuales se describen en otras partes en la presente descripción.

Un miembro de unión de la invención puede no inhibir la liberación de IL-6 inducida por la IL-17A humana mutante (sec. con núm. de ident.: 201) en células HT1080. Un miembro de unión de la invención puede no mostrar una potencia de neutralización significativa en un ensayo de liberación de IL-6 en células HT1080 por medio del uso de la IL-17A mutante (sec. con núm. de ident.: 201) a una concentración de 2 nM, por ejemplo cuando el miembro de unión está a una concentración de hasta 50 nM.

En un ensayo de liberación de IL-6 en células HT1080, un miembro de unión de la invención puede tener una IC50 más de 10-veces más alta, más de 20-veces más alta, más de 50-veces más alta o más de 100-veces más alta en un ensayo con 1 nM de IL-17A humana mutante (sec. con núm. de ident.: 201) que en un ensayo con 1 nM o 2 nM de IL-17A humana madura (sec. con núm. de ident.: 198). Datos de ejemplo se muestran en el Ejemplo 7.3 (Tabla 20b), que muestran que el Anticuerpo 7 tiene una potencia mucho más baja (IC50 más alta) para la IL-17A mutante en comparación con la IL-17A humana madura. Se observa que no se pudo determinar ningún valor de IC50 para el Anticuerpo 7 en el ensayo con la IL-17A mutante, lo que indica que cualquier valor de IC50 fue más alto que el que se puede medir en este ensayo.

Como se describe en otros lugares en la presente descripción, la unión de un miembro de unión a la IL-17 se puede determinar por medio del uso de la resonancia de plasmones superficiales por ejemplo BIAcore. Un miembro de unión de la invención puede por ejemplo no mostrar una unión significativa por ejemplo menos de aproximadamente 10 RU en un ensayo de resonancia de plasmones superficiales con la IL-17A humana mutante que tiene la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.: 201.

Los datos de resonancia de plasmones superficiales pueden ajustarse a un modelo de analito bivalente (k_a k_d simultáneas) y se puede calcular la constante de afinidad K_d a partir de la relación de constantes de velocidad k_d/k_a . Un miembro de unión de la invención puede tener una afinidad de unión a la IL-17A humana madura (sec. con núm. de ident.: 198) que es más de 5-veces, por ejemplo más de 10-veces o más de 50-veces, mayor que la de unión a la IL-17A humana mutante (sec. con núm. de ident.: 201).

Técnicas tales como la cristalografía de rayos X se pueden usar además para identificar los residuos de la IL-17A unidos por un miembro de unión, y puede ser útil confirmar y/o refinar los resultados de otras técnicas, por ejemplo identificar los residuos que se contactan por el miembro de unión. El uso de la cristalografía de rayos X de proteínas para determinar la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria se conoce bien por aquellos expertos en la materia y se usó previamente para mapear las partes de las proteínas que interactúan con los anticuerpos. (Padavattan y otros, 2007; Karpusas y otros 2001). Un polipéptido o péptido aislado que comprende, o un péptido aislado que consiste de, la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.: 199, se puede usar en métodos de generación, aislamiento y/o ensayo de miembros de unión adicionales para la IL-17A de acuerdo a la presente invención.

Correspondientemente, aspectos adicionales de la invención se relacionan a fragmentos aislados de la IL-17A humana madura de secuencia sec. con núm. de ident.: 198, los fragmentos que comprenden o consisten de la secuencia de aminoácidos sec. con núm. de ident.: 199. Los fragmentos pueden por ejemplo ser de hasta 20, 25, 30, 50 o 100 aminoácidos de largo. Uno o más fragmentos pueden formar parte de una secuencia de péptido o polipéptido más larga la cual no es una secuencia de aminoácidos de la IL-17A, por ejemplo, la cual no es la IL-17A precursora o madura por ejemplo no es la sec. con núm. de ident.: 198. Los péptidos o polipéptidos que comprenden un fragmento o fragmentos aislados de la secuencia de aminoácidos de la IL-17A pueden comprender residuos de aminoácidos adicionales, en donde los residuos adicionales no son contiguos con una secuencia de aminoácidos de la IL-17A. Por ejemplo, la sec. con núm. de ident.: 199 puede continuarse o precederse por uno o más residuos no contiguos con la sec. con núm. de ident.: 198. Los miembros de unión, por ejemplo moléculas de anticuerpo, para tales polipéptidos o péptidos son aspectos de la invención.

In vivo la IL-17A endógena está glicosilada y por lo tanto la IL-17A humana glicosilada es el antígeno objetivo terapéutico para la terapia humana. Mientras que la IL-17A humana recombinante, la cual puede derivarse de bacterias (por ejemplo expresada en *E. coli*) y no estar glicosilada, se puede usar en ensayos descritos en la presente descripción, demostramos además que miembros de unión de la invención pueden unir la IL-17A humana glicosilada, tal como la IL-17A que se produce por células T humanas o células de riñón embrionario humano (HEK) EBNA. Esto representa una ventaja significativa de los miembros de unión de la invención, ya que la IL-17A humana glicosilada es el antígeno objetivo para las aplicaciones humanas *in vivo*. La afinidad y/o potencia de los miembros de unión de la invención por la IL-17A glicosilada y no-glicosilada puede ser aproximadamente la misma.

Como se describe en más detalles en los ejemplos, los miembros de unión de acuerdo a la invención neutralizan la IL-17A con alta potencia. La neutralización significa la inhibición de la actividad biológica de la IL-17A. Los miembros de unión de la invención pueden neutralizar una o más actividades de la IL-17A. La actividad biológica inhibida es típicamente la unión de la IL-17A a uno o más de sus parejas de unión o receptores, por ejemplo al IL-17RA.

La neutralización de la unión de la IL-17 a su receptor se puede medir como liberación celular de una molécula biológica por ejemplo MMP13, PGE2 o una citocina tal como IL-6 o IL-8, en un ensayo biológico, a partir de que la unión de la IL-17A a su receptor induce la liberación celular de estas moléculas, la cual se puede determinar por medio del uso de ensayos apropiados, por ejemplo, en células HT1080 (disponible bajo ECACC Núm. 85111505), condrocitos u otras células o tipos de tejidos adecuados.

La inhibición de la actividad biológica puede ser parcial o total. En modalidades específicas, se proporcionan miembros de unión que inhiben la actividad biológica de la IL-17 en al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 60%, o al menos 50% de la actividad en ausencia del miembro de unión. El grado en el cual un miembro de unión neutraliza la IL-17A se conoce como su potencia neutralizante. La potencia se puede determinar o medir mediante el uso de uno o más ensayos conocidos por las personas con experiencia y/o como se describe o se refiere en la presente. Por ejemplo, la potencia se puede ensayar en:

- Ensayo de unión HTRF® (Fluorescencia homogénea de resolución temporal) *receptor-ligando*
- Ensayo de competencia epitópica HTRF®
- Ensayo de liberación de IL-6 de HT1080
- Ensayo de célula HT1080 por medio del uso de la liberación sinérgica de IL-6 en respuesta a IL-17 y TNF α
- Ensayo de liberación de IL-6/IL-8/MMP13/PGE2 de condrocitos
- Ensayo de liberación de IL-6 en explantes de cartílago

- Ensayo de liberación de IL-6 en fibroblastos sinoviales (por ejemplo de pacientes RA u OA), por ejemplo por medio del uso de respuesta sinérgica de IL-6 a IL-17 y TNF α

5 Los métodos de ensayo se describen en los Ejemplos.

La potencia de neutralización de un miembro de unión como se calcula en un ensayo por medio del uso de la IL-17 de una primera especie (por ejemplo humano) se puede comparar con la potencia de neutralización del miembro de unión en el mismo ensayo por medio del uso de la IL-17 de una segunda especie (por ejemplo cinomolgo), con el objetivo de evaluar la extensión de la reactividad cruzada del miembro de unión por la IL-17 de las dos especies.

10 Miembros de unión de la invención se unen a la IL-17A humana y a la IL-17A de mono cinomolgo, y puede tener una diferencia de menos de 30-veces, por ejemplo menos de 25-, 20-, 15-, 10-, 5- o 2-veces en la potencia para neutralizar la IL-17A humana y de cinomolgo, por ejemplo como se determina en un ensayo de liberación de IL-6 de HT1080.

15 Por ejemplo, los datos en la presente descripción indican que los Anticuerpo núms. 1-4 y 7-16 tienen una diferencia de menos de 20-veces en la potencia para neutralizar la IL-17A humana y de cinomolgo respectivamente, en un ensayo de liberación de IL-6 de HT1080 descrito en la presente descripción. Los datos se representan en el Ejemplo 2. Así, en algunas modalidades, la potencia de neutralización de miembros de unión de la invención para la IL-17A humana y de cinomolgo está dentro de 20-veces. En algunas modalidades la potencia de neutralización para la IL-17A humana y de cinomolgo es aproximadamente la misma o equipotente, es decir dentro de 10 veces.

25 La potencia se expresa normalmente como un valor de IC₅₀, en nM a menos que declare de cualquier otra forma. En ensayos funcionales, la IC₅₀ es la concentración de un miembro de unión que reduce una respuesta biológica en un 50% de su máximo. La IC₅₀ se puede calcular mediante el gráfico del % de la respuesta biológica máxima en función del logaritmo de la concentración de los miembros de unión, y el uso de un programa de software, tal como el Prism (GraphPad) u Origin (Origin Labs) para ajustar a una función sigmoideal los datos para generar valores de IC₅₀.

30 Un miembro de unión de la invención puede tener una potencia de neutralización o IC₅₀ de hasta 15 nM en un ensayo HTRF® para la IL-17A humana como se describe en la presente descripción. Este ensayo se puede usar para determinar la IC₅₀ para miembros de unión en formato scFv. La IC₅₀ puede ser por ejemplo hasta 10.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.0 ó 1.0 nM. Los ejemplos de los datos de la IC₅₀ se presentan en el Ejemplo 2 (ver la Tabla 5). Se usa una concentración final de 0.75 nM de IL-17A humana en el ensayo de unión receptor ligando HTRF® y se da un método detallado en los ejemplos.

35 Un miembro de unión de la invención puede tener una potencia de neutralización o IC₅₀ de hasta 40 nM en un ensayo de liberación de IL-6 de HT1080 por IL-17 humana. La IC₅₀ puede ser por ejemplo de hasta 35, 25, 20, 15, 10 ó 5 nM. Un miembro de unión de la invención puede tener una potencia de neutralización o IC₅₀ de hasta 3.0, 2.0 o 1.0 nM en un ensayo de liberación de IL-6 de HT1080 por IL-17 humana. Los ejemplos de los datos de la IC₅₀ se presentan en el Ejemplo 2 (ver la Tabla 6A). Este ensayo mide la liberación de IL-6 en respuesta a 1 nM de IL-17A humana y un método detallado se da en los ejemplos.

40 Un miembro de unión de la invención puede tener una valor de pA₂ de aproximadamente o menos que 10 en un ensayo de liberación de IL-6 de HT1080 por IL-17 humana. Métodos de análisis de pA₂ se describen en la sección de Ejemplos. Los datos del ejemplo se presentan en el Ejemplo 3 (ver la Tabla 8a).

45 Un miembro de unión de la invención puede tener una potencia de neutralización IC₅₀ de no más de 1 nM en un ensayo de células HT1080 al medir la liberación sinérgica de IL6 en respuesta a 125 pM de IL-17A humana y 25 pM de TNF α . Un miembro de unión de la invención puede tener una potencia de neutralización o IC₅₀ de no más de 1, 0.5, o 0.3 nM en este ensayo. Los ejemplos de los datos de la IC₅₀ se presentan en el Ejemplo 2 (ver la Tabla 6b).

50 Un miembro de unión de la invención puede tener una IC₅₀ de no más de 1 nM, por ejemplo no más de 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 0.1 nM para la inhibición de la liberación de IL-6 en células HT1080 estimulada por la IL-17A glicosilada de células T humanas. Los datos del ejemplo se presentan en el Ejemplo 2 (ver la Tabla 6c). Estos datos indican que los anticuerpos de la invención se unen y neutralizan la IL-17A humana nativa.

55 Ventajosamente, la alta potencia de neutralización se puede combinar con una buena reactividad cruzada entre especies. Así, por ejemplo, un miembro de unión puede tener una IC₅₀ de no más de 1 nM en un ensayo de liberación de IL-6 por HT1080 con IL-17A humana, en donde la IC₅₀ en el ensayo de HT1080 IL-17A humana no es más de 10-veces diferente de la IC₅₀ en el ensayo de HT1080 IL-17A de cinomolgo. La potencia de neutralización para la IL-17A humana puede ser mayor que con la de cinomolgo

60

Un miembro de unión de la invención puede tener una potencia de neutralización de IC₅₀ de hasta 150 nM en un ensayo de liberación de IL-6 de HT1080 por IL-17 de cinomolgo, por ejemplo en formato IgG1. La IC₅₀ puede ser por ejemplo de hasta 150, 100, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 ó 5 nM. Los ejemplos de los datos de IC₅₀ se presentan en el Ejemplo 2 (ver la Tabla 6A). Un concentración final de 1 nM de IL-17A de cinomolgo se usa en el ensayo de liberación de IL-6 en células HT1080 y un método detallado se da en los ejemplos.

La potencia para la inhibición de la liberación de IL-6, IL-8, MMP13, y/o PGE₂ se puede determinar en condrocitos primarios humanos por medio del uso de un ensayo como se describe en la presente descripción. Los ejemplos de los datos para los miembros de unión de esta invención en estos ensayos se muestran en el Ejemplo 4. Un miembro de unión de la invención puede tener una IC₅₀ de hasta 3.0 nM, por ejemplo hasta 2.0, 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3 o 0.2 nM, en un ensayo de liberación de IL-6 de condrocitos por medio del uso de IL-17 a una concentración de 0.2 nM. Un miembro de unión de la invención puede tener una IC₅₀ de hasta 20 nM, por ejemplo hasta 10, 5.0, 4.0, 3.0 o 2.0 nM en un ensayo de liberación de IL-6 de condrocitos por medio del uso de IL-17 a una concentración de 2 nM.

Un miembro de unión de la invención puede tener una IC₅₀ de hasta 3.0 nM, por ejemplo hasta 2.5, 2.3, 1.0, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 o 0.1 nM en un ensayo de liberación de IL-8 por condrocitos por medio del uso de IL-17 a una concentración de 0.2 nM. Un miembro de unión de la invención puede tener una IC₅₀ de hasta 8 nM, por ejemplo hasta 5, 4, 3, 2, 1.8, 1.6, 1.5, 1.0 o 0.8 nM en un ensayo de liberación de IL-8 por condrocitos por medio del uso de IL-17 a una concentración de 2 nM.

Un miembro de unión de la invención puede tener una IC₅₀ de hasta 5 nM, por ejemplo hasta 4, 3, 2, 1, 0.5 nM en un ensayo de liberación de MMP13 por condrocitos por medio del uso de IL-17 a una concentración de 0.2 nM. Un miembro de unión de la invención puede tener una IC₅₀ de hasta 40 nM, por ejemplo hasta 30, 20, 10, 5 nM, en un ensayo de liberación de MMP13 por condrocitos por medio del uso de IL-17 a una concentración de 2 nM.

Un miembro de unión de la invención puede tener una IC₅₀ de hasta 6 nM, por ejemplo hasta 5, 4, 3, 2, 1, 0.5 nM en un ensayo de liberación de PGE₂ por condrocitos por medio del uso de IL-17 a una concentración de 2 nM.

Los miembros de unión de la invención pueden exhibir actividad inhibitoria, por ejemplo al menos 80% o 90% de inhibición, o 100% de inhibición, en un ensayo de liberación de IL-6 por medio del uso de IL-17A a una concentración de 10 ng/ml en una respuesta sinérgica con TNF α a 1 ng/ml en un ensayo de explante de cartílago post-mortem. Un miembro de unión de la invención puede tener una IC₅₀ de no más de 5 nM, por ejemplo no más de 4, 3, 2, 1, 0.5 nM en un ensayo de liberación de IL-6 de explante de cartílago post-mortem por medio del uso de IL-17A a una concentración de 10 ng/ml en una respuesta sinérgica con TNF α a 1 ng/ml. Los datos del ejemplo se presentan en el Ejemplo 6.1 (Tablas 15a y 15b).

Los miembros de unión de la invención pueden exhibir actividad inhibitoria, por ejemplo al menos 50, 60 o 65 % de inhibición, en un ensayo de sinergia IL-17/TNF α en fibroblastos sinoviales OA, como se describe en la presente descripción (por ejemplo en un ensayo de liberación de IL-8 por medio del uso de 10 ng/ml o 1 ng/ml de IL-17 en un respuesta sinérgica con TNF α , donde la máxima respuesta tiene un componente de IL-17 y de TNF α). Los datos del ejemplo se presentan en el Ejemplo 6.2 (Tablas 16a y 16b).

Un miembro de unión de la invención puede tener una IC₅₀ de no más de 5 nM, por ejemplo no más de 4, 3 o 2 nM en un ensayo de liberación de IL-8 por fibroblastos sinoviales de RA por medio del uso de IL-17 a una concentración de 2 nM. Los datos del ejemplo se presentan en el Ejemplo 6.3 (Tabla 17).

Un miembro de unión de la invención puede tener una IC₅₀ de no más de 5 nM, por ejemplo no más de 4, 3 o 2 nM en un ensayo de liberación de IL-8 por fibroblastos sinoviales de RA sinérgico de IL-17A más TNF α por medio del uso de IL-17 a una concentración de 1 nM y TNF α a 0.1 ng/ml. Los datos del ejemplo se presentan en el Ejemplo 6.3 (Tabla 17).

En un ensayo de bolsa de aire pre-mezclado de ratón que se describe en la presente descripción; un miembro de unión de la invención puede inhibir la liberación de IL-6 inducida por la IL-17A (pre-mezclada con el miembro de unión) por al menos 25%, por ejemplo al menos 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60%. La inhibición puede ser aproximadamente 100%. Un miembro de unión puede tener, por ejemplo, una ID₅₀ de hasta 10, por ejemplo hasta 5, 4, 3, 2 ó 0.5 μ g en este ensayo. Además en el ensayo de bolsa de aire pre-mezclado en ratón descrito en la presente descripción, un miembro de unión de la invención puede inhibir el flujo de leucocitos inducido por la IL-17A en al menos 80%, por ejemplo al menos 85, 90, 95, 98 o 99%. La inhibición puede ser aproximadamente 100%. Un miembro de unión puede tener, por ejemplo, una ID₅₀ de hasta 5, 4, 3, 2 ó 1 μ g en este ensayo. Datos de ejemplo para un miembro de unión de la invención con los conjuntos de CDRs del Anticuerpo 2 y el Anticuerpo 7 se presentan en el Ejemplo 5 (ver Tabla 13a y Tabla 14a).

En un ensayo de bolsa de aire en un ratón dosificado sistémicamente descrito en la presente descripción, un miembro de

unión de la invención puede inhibir la liberación de IL-6 inducida por la IL-17A (el miembro de unión se dosifica sistémicamente seguido por la administración de IL-17A a la bolsa de aire) en al menos 70%, por ejemplo al menos 75, 80 u 85%. Un miembro de unión puede tener, por ejemplo, una ID_{50} de hasta 1 μg , por ejemplo hasta 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 ó 0.05 μg en este ensayo. Además en el ensayo de bolsa de aire en el ratón dosificado sistémicamente descrito en la presente descripción, un miembro de unión de la invención puede inhibir el flujo de leucocitos inducido por la IL-17A en al menos 70%, por ejemplo al menos 75, 80, 85, 90 o 95%. La inhibición puede ser aproximadamente 100%. Un miembro de unión puede tener, por ejemplo, una ID_{50} de hasta 2, por ejemplo hasta 1.5, 1, 0.9, 0.8, 0.7 ó 0.6 μg en este ensayo. Datos de ejemplo para un miembro de unión de la invención con los conjuntos de CDRs del Anticuerpo 7 se presentan en el Ejemplo 5 (ver Tabla 13b y Tabla 14b).

Los datos obtenidos en el ensayo de bolsa de aire como se describe en el Ejemplo 5 demuestran la habilidad de un miembro de unión de inhibir las respuestas inducidas por la IL-17A cuando se administra localmente o sistémicamente. Los datos indican que la administración de un miembro de unión de la invención es efectiva para tratar trastornos asociados con la IL-17A en sitios localizados de inflamación, y así es útil para tratar trastornos tales como la artritis reumatoide a través de la inhibición de las respuestas inducidas por la IL-17A en la articulación sinovial. Es notable que la administración sistémica de un miembro de unión de la invención mostró ser efectiva para inhibir los efectos de la IL-17A, y que no se requirió administración local para una inhibición efectiva. Esta es una ventaja particular para el uso clínico de los miembros de unión, por ejemplo en el hombre, donde se puede usar la administración sistémica, y donde el sitio de administración frecuentemente está separado del sitio o sitios donde se manifiesta el trastorno, por ejemplo el sitio, o sitios de la inflamación, tales como la articulación sinovial.

Además, la cinética de unión y la afinidad (expresadas como la constante de equilibrio de disociación, K_d) de miembros de unión a la IL-17A por la IL-17A se puede determinar, por ejemplo por medio del uso de resonancia de plasmones superficiales tal como BIAcore, o la K_d se puede estimar a partir del análisis de pA_2 .

Un miembro de unión de la invención puede por ejemplo tener una K_d para la IL-17A humana de menos de 1000 pM, por ejemplo menos 600, 500, 400, 300 o 200 pM según se calcula a partir del análisis de pA_2 en el ensayo de liberación de IL-6 de HT1080 por IL-17.

Como se describe en otros lugares en la presente descripción, la resonancia de plasmones superficiales implica el paso de un analito en fase fluida sobre un ligando unido a un soporte, y determinar la unión entre el analito y el ligando. Puede llevarse a cabo la resonancia de plasmones superficiales por ejemplo en la cual la IL-17A pasa en fase fluida sobre un miembro de unión unido a un soporte. Los datos de la resonancia de plasmones superficiales se pueden ajustar a un modelo de datos de analito bivalente o a un modelo de datos de analito monovalente. Como se muestra en los Ejemplos en la presente descripción, se encontró que un modelo de datos de analito bivalente fue particularmente adecuado para la determinación de la afinidad de los miembros de unión a la IL-17. Una constante de afinidad K_d se puede calcular a partir de la relación de constantes de velocidad k_{d1}/k_{a1} como se determinaron por la resonancia de plasmones superficiales por medio del uso de un modelo de datos de analito bivalente.

Ejemplos de valores de KD estimados para la unión de IL-17 que se calcularon por medio del uso de la resonancia de plasmones superficiales se presentan en el Ejemplo 3 (ver Tabla 8b). Estos datos demuestran buenas propiedades de unión del Anticuerpo 7 por la IL-17A humana producida recombinantemente por la expresión en *E. coli* o en células HEK EBNA. La unión de la IL-17A a partir de células HEK EBNA demostró que el anticuerpo se une a la IL-17A humana glicosilada nativa. La unión por el Anticuerpo 7 de la forma glicosilada nativa indica que todos los Anticuerpos 1 al 16 son capaces de unir la IL-17A humana glicosilada nativa, dado que todos estos anticuerpos derivaron de un único anticuerpo parental (Anticuerpo 1) y así se cree que todos unen los mismos o muy similares epítopos de la IL-17A.

Un miembro de unión de la invención puede tener una diferencia de menos de 5-veces, por ejemplo menos de 2.5-veces o menos de 2 veces, en la afinidad para la unión a la IL-17A humana expresada en células humanas (por ejemplo IL-17A derivada de HEK EBNA) que para la unión a la IL-17A humana expresada en células de bacteria (por ejemplo IL-17A derivada de *E. coli*).

Un miembro de unión de la invención puede tener una K_d para la IL-17A humana de aproximadamente o menos de 2.5 nM, calculada a partir de la relación de constantes de velocidad k_{d1}/k_{a1} según se determinó por la resonancia de plasmones superficiales por medio del uso de un modelo de datos de analito bivalente. Por ejemplo, un miembro de unión de la invención puede tener una K_d para la IL-17A humana de menos de 2.5 nM, 2 nM, 1.5nM, 1.0 nM o 0.5 nM calculadas a partir de la relación de constantes de velocidad k_{d1}/k_{a1} según se determinó por medio del uso de la resonancia de plasmones superficiales, por medio del uso de un modelo de datos de analito bivalente.

Un miembro de unión de la invención puede tener una afinidad para la IL-17A humana de aproximadamente o menor de 0.3

nM, según se determinó por la resonancia de plasmones superficiales por medio del uso de un modelo de datos de analito monovalente. Un miembro de unión de la invención puede por ejemplo tener una K_d para la IL-17A humana de menos de 300 pM, por ejemplo menos de 200 pM, según se calculó por medio del uso de la resonancia de plasmones superficiales por medio del uso de un modelo de datos monovalente.

5

Un miembro de unión de la invención puede tener una K_d para la IL-17A de cinomolgo de aproximadamente o menos de 1.5 nM calculada a partir de la relación de constantes de velocidad k_{d1}/k_{a1} según se determinó por la resonancia de plasmones superficiales por medio del uso de un modelo de datos de analito bivalente.

10

Los miembros de unión de la invención pueden tener una diferencia de menos de 10-veces en la afinidad por la IL-17A humana y de cinomolgo, por ejemplo según se determinó por medio del uso de la resonancia de plasmones superficiales, por medio del uso de un modelo monovalente o bivalente para ajustar los datos. Así, un miembro de unión de la invención puede unir la IL-17A de cinomolgo con una K_d menos de 10-veces diferente que para unir la IL-17A humana, por ejemplo una diferencia de menos de 5-veces o menos de 3-veces, según se determinó por medio del uso de la resonancia de plasmones superficiales. Como se señaló en otra parte en la presente descripción, una constante de afinidad K_d se puede calcular a partir de la relación de constantes de velocidad k_{d1}/k_{a1} según se determinaron por la resonancia de plasmones superficiales por medio del uso de un modelo de datos de analito bivalente. Como se ilustra en el Ejemplo 3 y la Tabla 8b, se determinó una buena reactividad cruzada en la unión de la IL-17A humana y de cinomolgo para el Anticuerpo 7.

15

20

Los datos de reactividad cruzada obtenidos para el Anticuerpo 7 se pueden tomar como representativos de la reactividad cruzada para todos los Anticuerpos 1 al 16, dado que todos estos anticuerpos se derivaron a partir de un único anticuerpo parental (Anticuerpo 1) y así se cree que todos unen los mismos o altamente similares epítopos de la IL-17.

25

Los datos que se informan en la presente descripción indican que los miembros de unión de la invención no tienen reactividad cruzada con los homólogos de la IL-17 IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E o IL-17F. Se observa una unión débil con la IL-17F en algunos casos. La reactividad cruzada se puede determinar por ejemplo al medir el grado de inhibición por un homólogo de la IL-17 de la unión de la IL-17A a un miembro de unión de la invención, por ejemplo por medio del uso de un ensayo de competencia de epítipo HTRF® como se describe en la presente descripción. Como se describe en la presente descripción, los homólogos B-E de la IL-17 no inhiben significativamente la unión de la IL-17A a miembros de unión de la invención en tal ensayo, lo que demuestra que los miembros de unión no tienen reactividad cruzada con los homólogos de la IL-17 B a E.

30

Un miembro de unión de la invención puede mostrar inhibición parcial (es decir, menos del 100 %) de la unión a la IL-17A en un ensayo de competencia de epítopos con la IL-17F, por ejemplo en donde la IL-17F está a una concentración de 1 μ M o más. Por ejemplo, la IL-17F puede inhibir la unión a la IL-17A por no más del 50 %, por ejemplo no más que aproximadamente el 20%.

35

Ninguna de las IL-17B, C, D, E ni F puede ser capaz de inhibir totalmente la unión de un miembro de unión a la IL-17A humana. La unión de un miembro de unión de la invención a la IL-17A humana puede no inhibirse totalmente por 1 μ M de ninguna de las IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E o IL-17F (individualmente) en un ensayo de competencia de epítopos. Así, la unión del miembro de unión a la IL-17A humana puede no inhibirse por más del 50%, por ejemplo no más del 20%, por 1 μ M de ninguna de las IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E o IL-17F en un ensayo de competencia de epítopos por medio del uso de la IL-17A etiquetada a una concentración igual a la constante de disociación K_d de la interacción del miembro de unión con la IL-17A humana, en donde dicha K_d se calcula a partir de la relación de constantes de velocidad k_{d1}/k_{a1} según se determinó por la resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo BIAcore, por medio del uso de un modelo de datos de analito bivalente. La unión del miembro de unión a la IL-17A humana en tal ensayo de competencia de epítopos puede por ejemplo no inhibirse por 1 μ M de ninguna de las IL-17B, IL-17C, IL-17D o IL-17E, y puede no inhibirse, o puede inhibirse pero menos del 50 %, por 1 μ M de IL-17F.

45

50

Los datos del ejemplo en el ensayo de competencia de epítopos se presentan en el Ejemplo 2.7 (ver Tabla 7). Los valores de IC50 no pudieron determinarse en un ensayo de competencia de epítopos con las IL-17B, C, D, E o F, lo que indica que los valores de IC50 fueron demasiado altos para medirlos en este ensayo.

55

La limitada reactividad cruzada con los homólogos de la IL-17 que exhiben los miembros de unión de la invención ofrece una ventaja para su uso terapéutico y/o diagnóstico, particularmente en aplicaciones *in vivo* donde es deseable inhibir específicamente la IL-17A. Los efectos colaterales causados por la reactividad cruzada no deseada se reducen. Más aun, se pueden usar concentraciones más bajas de los miembro de unión, ya que la limitada reactividad cruzada significa que más de la dosis administrada del miembro de unión está disponible para unirse a la IL-17A objetivo. Esto representa una ventaja particular en la dosificación para las aplicaciones terapéuticas *in vivo*.

Un miembro de unión de la invención puede comprender una molécula de anticuerpo, por ejemplo una molécula de anticuerpo humana. El miembro de unión normalmente comprende un dominio de anticuerpo VH y/o VL. Los dominios VH de los miembros de unión además se proporcionan como parte de la invención. Dentro de cada uno de los dominios VH y VL están las regiones determinantes de la complementariedad, ("CDR"), y las regiones marco, ("FR"). Un dominio VH comprende un conjunto de HCDR, y un dominio VL comprende un conjunto de LCDR. Una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VH de anticuerpo que comprende un VH CDR1, CDR2 y CDR3 y un marco. Puede alternativamente o además comprender un dominio VL de anticuerpo que comprende un VL CDR1, CDR2 y CDR3 y un marco. Un marco del dominio VH o VL comprende cuatro regiones de marco, FR1, FR2, FR3 y FR4, intercaladas con las CDR en la siguiente estructura:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4.

Los ejemplos de los dominios VH y VL de anticuerpo, FR y CDR de acuerdo con la presente invención son los enumerados en la lista de secuencias adjunta que forma parte de la presente descripción. CDR ilustrativas adicionales se describen más abajo y en la Tabla 21. Todas las secuencias de VH y VL, las secuencias de las CDR, los conjuntos de las CDR y los conjuntos de las HCDR y los conjuntos de las LCDRs descritos en la presente descripción representan aspectos y modalidades de la invención. Como se describe en la presente descripción, a "un conjunto de CDR" comprende CDR1, CDR2 y CDR3. Así, un conjunto de HCDR se refiere a HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y un conjunto de LCDR se refiere a LCDR1, LCDR2 y LCDR3. A menos que se indique de cualquier otra forma, un "conjunto de CDR" incluye HCDR y LCDR. Típicamente los miembros de unión de la invención son anticuerpos monoclonales.

Un aspecto adicional de la invención es una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH que tiene al menos 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad en la secuencia de aminoácidos con un dominio VH de cualquiera de los anticuerpos 1 al 16 que se muestran en la lista de secuencias adjunta, y/o que comprenden un dominio VL que tiene al menos 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad en la secuencia de aminoácidos con un dominio VL de cualquiera de los anticuerpos 1 al 16 que se muestran en la lista de secuencias adjunta. Los algoritmos que se pueden usar para calcular el % de identidad de dos secuencias de aminoácidos incluyen, por ejemplo, BLAST (Altschul y otros. 1990), FASTA (Pearson & Lipman 1988), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith & Waterman 1981), por ejemplo, al emplear parámetros predeterminados.

Un miembro de unión de la invención puede comprender un sitio de unión al antígeno dentro de una molécula que no es un anticuerpo, normalmente proporcionado por una o varias CDR, por ejemplo una HCDR3 y/o LCDR3, o un conjunto de CDR en un andamio de proteína que no es un anticuerpo, como se explica más abajo.

Como se describe en más detalles en la Parte Experimental, aislamos una molécula de anticuerpo parental (anticuerpo núm. 1) con un conjunto de secuencias de CDR como se muestra en la Tabla 21. A través de un proceso de optimización se generó un grupo de clones de anticuerpos numerados 2 al 16, con secuencias de las CDR3 derivadas de las secuencias de las CDR3 parentales y que tienen sustituciones en las posiciones que se indican en la Tabla 21. Así por ejemplo se puede ver a partir de la Tabla 21 que el Anticuerpo 2 tiene las secuencias parentales HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1 y LCDR2, y tiene una secuencia parental LCDR3 en la cual los residuos de Kabat 93 y 94 se reemplazan con P y H, respectivamente.

La molécula de anticuerpo parental, y las moléculas de anticuerpo 2 al 16, como se describe en la presente descripción se refieren respectivamente a moléculas de anticuerpo con CDRs de la molécula de anticuerpo parental y a moléculas de anticuerpo con CDRs de las moléculas de anticuerpo 2 al 16.

Se describe en la presente un miembro de unión que comprende el conjunto parental de las CDR como se muestra en la Tabla 21, en el cual HCDR1 es la sec. con núm. ident.: 3 (residuos de Kabat 31-35), HCDR2 es la sec. con núm. ident.: 4 (residuos de Kabat 50-65), HCDR3 es la sec. con núm. ident.: 5 (residuos de Kabat 95-102), LCDR1 es la sec. con núm. ident.: 8 (residuos de Kabat 24-34), LCDR2 es la sec. con núm. ident.: 9 (residuos de Kabat 50-56) y LCDR3 es la sec. con núm. ident.: 10 (residuos de Kabat 89-97).

Un miembro de unión de la invención puede comprender una o más CDRs como se describe en la presente descripción, por ejemplo una CDR3, y opcionalmente una CDR1 y CDR2 para formar un conjunto de CDRs. El CDR o conjunto de CDRs puede ser un CDR parental o un conjunto parental de CDRs, o puede ser un CDR o conjunto de CDRs de cualquiera de los anticuerpos 2 al 16, o puede ser una variante de los mismos como se describe en la presente descripción.

Por ejemplo, un miembro de unión o un dominio VL de acuerdo a la invención puede comprender el LCDR3 parental con los residuos de Kabat 93 y 94 reemplazados por P y H, respectivamente.

Un miembro de unión o un dominio VH puede comprender el HCDR3 parental con una o más de las siguientes

sustituciones:

el residuo de Kabat 98 reemplazado por F o H;
 el residuo de Kabat 100A reemplazado por G o T;
 el residuo de Kabat 101 reemplazado por R;
 el residuo de Kabat 102 reemplazado por G o N.

Un miembro de unión, o un dominio VL del mismo puede comprender la LCDR3 parental con una o más de las siguientes sustituciones:

el residuo de Kabat 90 reemplazado por T;
 el residuo de Kabat 92 reemplazado por N o S;
 el residuo de Kabat 93 reemplazado por H o P;
 el residuo de Kabat 94 reemplazado por H, K, R, T o Y;
 el residuo de Kabat 95 reemplazado por D, N o V;
 el residuo de Kabat 96 reemplazado por I o Q.

La sustitución de D en la posición de Kabat 93 en LCDR3 con P se asocia con una mayor potencia de un miembro de unión contra la IL-17A humana y/o de cinomolgo.

Los miembros de unión de la invención pueden comprender una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 de cualquiera de los anticuerpos 1 a 16 y/o una LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 de cualquiera de los anticuerpos 1 a 16, por ejemplo un conjunto de CDR de cualquiera de los anticuerpos 1 a 16 mostrados en la Tabla 21. Un miembro de unión puede comprender un conjunto de VH CDR de uno de estos anticuerpos. Opcionalmente puede comprender además un conjunto de VL CDR de uno de estos anticuerpos, y las VL CDR pueden ser del mismo anticuerpo o uno diferente como las VH CDRs. Un dominio de VH que comprende un conjunto de HCDRs de cualquiera de los anticuerpos 1 al 16, y/o un dominio de VH que comprende un conjunto de LCDRs de cualquiera de los anticuerpos 1 al 16, son además modalidades individuales de la invención.

Típicamente, un dominio VH se aparea con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión antígeno anticuerpo, aunque como se discutió más abajo un dominio VH o VL solo se puede usar para unirse al antígeno. En una modalidad, el dominio VH del anticuerpo 1 se aparea con el dominio VL del anticuerpo 1, de manera que se forma un sitio de unión del antígeno en el anticuerpo que comprende tanto los dominios VH y VL del anticuerpo. Se proporcionan modalidades análogas para los demás dominios VH y VL descritos en la presente. En otras modalidades, la VH del anticuerpo 1 está apareada con un dominio VL diferente de la VL del anticuerpo 1. La promiscuidad en las cadenas ligeras está bien establecida en la materia. Una vez más, modalidades análogas se proporcionan por la invención para los otros dominios VH y VL descritos en la presente. Así, la VH del parental o de cualquiera de los anticuerpos 2 al 16 puede aparearse con la VL del parental o de cualquiera de los anticuerpos 2 al 16.

Un aspecto de la invención es una molécula de anticuerpo aislada que comprende un dominio VH con la secuencia de aminoácidos del dominio VH que se muestra en sec. con núm. de ident.: 62 y un dominio VL con la secuencia de aminoácidos del dominio VL que se muestra en sec. con núm. de ident.: 67 o sec. con núm. de ident.: 176.

Un miembro de unión puede comprender un conjunto de CDR H y/o L de cualquiera de los anticuerpos 2 al 16 con diez o nueve o menos, por ejemplo una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones dentro del conjunto descrito de CDRs H y/o L. Por ejemplo, un miembro de unión de la invención puede comprender el conjunto de CDRs H y/o L del Anticuerpo 7 con 10 o menos sustituciones, por ejemplo cinco o menos sustituciones, por ejemplo cero, una o dos sustituciones. Las sustituciones se pueden hacer potencialmente en cualquier residuo en el conjunto de CDRs, y pueden estar en la CDR1, CDR2 y/o CDR3.

Las sustituciones pueden estar en la CDR3, por ejemplo, en las posiciones sustituidas en cualquiera de los Anticuerpos 2 al 16, como se muestra en la Tabla 21. Así, una o más sustituciones pueden comprender una o más sustituciones en los siguientes residuos:

el residuo de Kabat 98, 100A, 101 ó 102 en HCDR3; o
 el residuo de Kabat 90, 92, 93, 94, 95 ó 96 en LCDR3.

Así, una CDR3 puede por ejemplo ser una LCDR3 parental (Anticuerpo 1) que tiene una sustitución en los residuos de Kabat 93 y/o 94.

Los ejemplos de sustituciones en CDRs parentales se describen en otros lugares en la presente descripción. Como se describió, las sustituciones pueden comprender una o más sustituciones como se muestra en la Tabla 21.

[0106] Un miembro de unión de la invención puede comprender una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 como sigue a continuación:

HCDR1 en donde el residuo de Kabat 31 es Ser, Ala, Gly, Thr o Cys por ejemplo Ser y/o el residuo de Kabat 32 es Tyr;
 HCDR2 en donde el residuo de Kabat 58 es Tyr o Phe, por ejemplo Tyr;
 HCDR3 en donde

El residuo de Kabat 96 es un residuo hidrofóbico, es decir un residuo de amino ácido con una cadena lateral no-polar, por ejemplo Leu, Ile, Val, Ala o Phe, por ejemplo Leu,

El residuo de Kabat 97 es un residuo hidrofóbico por ejemplo Ile, Leu, Val, Ala o Phe, por ejemplo, Ile, y/o

El residuo de Kabat 98 es un residuo cíclico, es decir un residuo de amino ácido con una cadena lateral que comprende una porción cíclica. Por ejemplo, el residuo de Kabat 98 puede ser His, Trp o Phe, por ejemplo His o Trp, por ejemplo His.

Como se indica en el Ejemplo 7.4, los residuos en estas posiciones de las HCDR pueden unir la IL-17A.

Un miembro de unión de la invención puede comprender una LCDR1 y/o LCDR3 como sigue a continuación:
 LCDR1 en donde el residuo de Kabat 31 es Tyr o Phe, por ejemplo Tyr, y/o el residuo de Kabat 32 es Tyr o Phe, por ejemplo Tyr;

LCDR3 en donde el residuo de Kabat 91 es Tyr y/o el residuo de Kabat 93 es Pro, hidroxiprolina, His, metilhistidina Asp, por ejemplo Pro o His, por ejemplo Pro.

Opcionalmente, el residuo de Kabat 29 en LCDR1 es Ala y/o el residuo de Kabat 30 en LCDR1 es Asn.

Opcionalmente, un miembro de unión de la invención puede comprender una LCDR2 en donde el residuo de Kabat 53 es un residuo de amino ácido con una cadena lateral polar no cargada, por ejemplo Gln.

Como se indica en el Ejemplo 7.4, los residuos en estas posiciones de las LCDR pueden unir la IL-17A

Por ejemplo, un miembro de unión de la invención puede comprender un conjunto de CDRs: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, que comprende 7 o más, por ejemplo 8, 9 o todos de los siguientes residuos:

- Ser, Ala, Gly, Thr o Cys, por ejemplo Ser, en el residuo de Kabat 31 de HCDR1;
- Tyr en el residuo de Kabat 32 de HCDR1;
- Tyr o Phe, por ejemplo Tyr, en el residuo de Kabat 58 de HCDR2;
- un residuo hidrofóbico, por ejemplo, Leu, Ile, Val, Ala o Phe, por ejemplo Leu, en el residuo de Kabat 96;
- un residuo hidrofóbico, por ejemplo Ile, Leu, Val, Ala o Phe, por ejemplo Ile, en el residuo de Kabat 97 de HCDR3;
- un residuo cíclico por ejemplo, His, Trp o Phe, por ejemplo His o Trp, por ejemplo His, en el residuo de Kabat 98 de CDR3;
- Tyr o Phe, por ejemplo Tyr, en el residuo de Kabat 31 de LCDR1;
- Tyr o Phe, por ejemplo Tyr, en el residuo de Kabat 32 de LCDR1;
- Tyr en el residuo de Kabat 91 de LCDR3; y
- Pro, hidroxiprolina, His o 3-metilhistidina, por ejemplo, Pro o His, por ejemplo, Pro, en el residuo de Kabat 93 de LCDR3.

El miembro de unión puede comprender un conjunto de CDR en donde:

el residuo de Kabat 31 de HCDR1 es Ser;
 el residuo de Kabat 32 de HCDR1 es Tyr;
 el residuo de Kabat 58 de HCDR2 es Tyr;
 el residuo de Kabat 96 de HCDR3 es Leu;
 el residuo de Kabat 97 de HCDR3 es Ile; el residuo de Kabat 98 de HCDR3 es His;
 el residuo de Kabat 31 de LCDR1 es Tyr;
 el residuo de Kabat 32 de LCDR1 es Tyr;
 en el residuo de Kabat 91 de LCDR3 es Tyr; y
 el residuo de Kabat 93 de LCDR3 es Pro.

En un miembro de unión de la invención:

HCDR1 puede ser de una longitud de 5 aminoácidos, consistente de los residuos de Kabat 31-35;
 HCDR2 puede ser de una longitud de 17 aminoácidos, consistente de los residuos de Kabat 50-65;

HCDR3 puede ser de una longitud de 9 aminoácidos, consistente de los residuos de Kabat 95-102;
 LCDR1 puede ser de una longitud de 13 aminoácidos, consistente de los residuos de Kabat 24-34;
 LCDR2 puede ser de una longitud de 7 aminoácidos, consistente de los residuos de Kabat 50-56; y/o
 LCDR3 puede ser de una longitud de 9 aminoácidos, consistente de los residuos de Kabat 89-97.

5 La numeración de Kabat de un conjunto de HCDR y LCDR, en donde HCDR1 comprende los residuos de Kabat 31-35, HCDR2 comprende los residuos de Kabat 50-65, HCDR3 comprende los residuos de Kabat 95-102, LCDR1 comprende los residuos de Kabat 24-34, LCDR2 comprende los residuos de Kabat 50-56 y LCDR3 comprende los residuos de Kabat 89-97, se ejemplifica en la Tabla 21.

10 Un miembro de unión puede comprender una molécula de anticuerpo que tiene una o más CDR, por ejemplo un conjunto de CDR en un marco de anticuerpo. Por ejemplo, una o más CDR o un conjunto de CDR de un anticuerpo puede ser injertado en un marco (por ejemplo, marco humano) para proporcionar una molécula de anticuerpo. Las regiones marco pueden comprender secuencias de segmentos de genes humanos de línea germinal. Por lo tanto, el marco puede transformarse a línea germinal en la cual uno o más residuos dentro del marco se cambian para que coincidan con los residuos en la posición equivalente en el marco de la línea germinal humana más similar. La persona con experiencia puede seleccionar un segmento de línea germinal que es el más cercano en secuencia a la secuencia del marco del anticuerpo antes de transformarlo a línea germinal y evaluar la afinidad o actividad de los anticuerpos para confirmar que la transformación a línea germinal no redujo significativamente la unión al antígeno o la potencia en los ensayos que se describen en la presente descripción. Los segmentos de genes humanos de línea germinal se conocen por los expertos en la materia y se pueden acceder por ejemplo a partir de la compilación VBase.

25 En una modalidad, un miembro de unión de la invención es una molécula de anticuerpo humano aislado que tiene un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR en un marco de la línea germinal humana, por ejemplo VH3-23. Así, las regiones de marco del dominio VH, FR1, FR2 y/o FR3, pueden comprender regiones de marco del segmento de gen de la línea germinal humana VH3-23. FR4 puede comprender una región marco de los segmentos j de línea germinal humanos JH1, JH4 o JH5 (estos segmentos j tienen secuencias de aminoácidos idénticas) o puede comprender una región marco del segmento j de línea germinal humano JH3. La secuencia de aminoácidos de VH FR1 puede ser la sec. con núm. de ident.: 189. La secuencia de aminoácidos de VH FR2 puede ser la sec. con núm. de ident.: 190. La secuencia de aminoácidos de VH FR3 puede ser la sec. con núm. de ident.: 191. La secuencia de aminoácidos de VH FR4 puede ser la sec. con núm. de ident.: 192. Normalmente el miembro de unión además tiene un dominio VL que comprende un conjunto de LCDRs, por ejemplo en un marco de línea germinal humano, por ejemplo VL6a. Así, las regiones de marco del dominio VL, FR1, FR2 y/o FR3, pueden comprender regiones de marco del segmento de gen de la línea germinal humana VL6a. FR4 puede comprender una región marco de los segmentos j de línea germinal humanos JL2 o JL3 (estos segmentos j tienen secuencias de aminoácidos idénticas). La secuencia de aminoácidos de VL FR1 puede ser la sec. con núm. de ident.: 193. La secuencia de aminoácidos de VL FR2 puede ser la sec. con núm. de ident.: 194. La secuencia de aminoácidos de VL FR3 puede ser la sec. con núm. de ident.: 195. La secuencia de aminoácidos de VL FR4 puede ser la sec. con núm. de ident.: 196. Un dominio de VH o VL que se transforma a línea germinal puede o no transformarse a línea germinal en uno o más residuos de Vernier, pero normalmente no.

40 Una molécula de anticuerpo o dominio VH de la invención puede comprender una VH FR1 en donde el residuo de Kabat 28 es Thr o Ser, por ejemplo Thr, y/o el residuo de Kabat 30 es Ser o Thr, por ejemplo, Ser.

45 Una molécula de anticuerpo o dominio VL de la invención puede comprender una VL FR2 en donde el residuo de Kabat 49 es un residuo hidrofóbico por ejemplo Phe, Tyr o His, por ejemplo, Phe.

Como se indica en el Ejemplo 7.4, Thr28 y Ser30 en el marco del dominio VH y Phe49 en el marco del dominio VL pueden unir IL-17A.

50 Una molécula de anticuerpo o dominio VL de la invención puede comprender el siguiente conjunto de regiones marco de cadena pesada:

FR1 sec. con núm. de ident.: 189;

FR2 sec. con núm. de ident.: 190;

FR3 sec. con núm. de ident.: 191;

55 FR4 sec. con núm. de ident.: 192;

o puede comprender dicho conjunto de regiones marco de cadena pesada con uno, dos, tres, cuatro o cinco alteraciones de aminoácidos, por ejemplo sustituciones.

60 Una molécula de anticuerpo o dominio VL de la invención puede comprender el siguiente conjunto de regiones marco de cadena ligera:

FR1 sec. con núm. de ident.: 193;
 FR2 sec. con núm. de ident.: 194;
 FR3 sec. con núm. de ident.: 195;
 FR4 sec. con núm. de ident.: 196;

5 o puede comprender dicho conjunto de regiones marco de cadena ligera con uno, dos, tres, cuatro o cinco alteraciones de aminoácidos, por ejemplo sustituciones.

10 La alteración de un amino ácido puede ser una sustitución, una inserción o una delección. Las alteraciones opcionalmente no se hacen en el residuo de Kabat Thr28 en VH FR1, el residuo de Kabat Ser30 en VH FR1 y/o el residuo de Kabat Phe49 en VL FR2.

Por ejemplo, una molécula de anticuerpo de la invención puede comprender un conjunto de regiones marco de cadena pesada y ligera, en donde

15 FR1 de cadena pesada es la sec. con núm. de ident.: 189;
 FR2 de cadena pesada es la sec. con núm. de ident.: 190;
 FR3 de cadena pesada es la sec. con núm. de ident.: 191;
 FR4 de cadena pesada es la sec. con núm. de ident.: 192;
 FR1 de cadena ligera es la sec. con núm. de ident.: 193;
 FR2 de cadena ligera es la sec. con núm. de ident.: 194;
 20 FR3 de cadena ligera es la sec. con núm. de ident.: 195;
 FR4 de cadena ligera es la sec. con núm. de ident.: 196;

o puede comprender dicho conjunto de regiones marco de cadena pesada y ligera con 10 o menos, por ejemplo cinco o menos, alteraciones de aminoácidos, por ejemplo, sustituciones. Por ejemplo puede haber una o dos sustituciones de aminoácidos en dicho conjunto de regiones marco de cadena pesada y ligera .

25 Un anticuerpo que no se transformó a línea germinal tiene las mismas CDRs, pero marcos diferentes, en comparación con un anticuerpo que se transformó a línea germinal.

30 De las secuencias de anticuerpo que se muestran en la presente descripción, los dominios VH de los anticuerpos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 13, 14 y 15 se transforman a línea germinal, los dominios VH de los anticuerpos 1, 8, 9, 10, 11, 12 y 16 no se transforman a línea germinal, los dominios VL de los anticuerpos 2 y 7 se transforman a línea germinal, y los dominios VL de los anticuerpos 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 no se transforman a línea germinal.

35 Un miembro de unión de la presente invención puede ser uno que compite por la unión a IL-17 con cualquier miembro de unión los cuales ambos unen IL-17 y comprenden un miembro de unión, dominio VH y/o VL, CDR por ejemplo HCDR3, y/o conjunto de CDRs descritos en la presente descripción. La competencia entre los miembros de unión puede ensayarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo usando ELISA y/o mediante el etiquetado de una molécula reportera específica a un miembro de unión que se puede detectar en presencia de uno o más de otros miembros de unión no etiquetados, para permitir la identificación de los miembros de unión que se unen al mismo epítipo o un epítipo superpuesto. La competencia se puede determinar por ejemplo por medio del uso de ELISA en el cual la IL-17 se inmoviliza a una placa y un primer miembro de unión etiquetado junto con uno o más miembros de unión no etiquetados se añade a la placa. La presencia de un miembro de unión no etiquetado que compite con el miembro de unión etiquetado se observa por una disminución en la señal emitida por el miembro de unión etiquetado. Tales métodos son fácilmente conocidos por alguien con experiencia en la materia, y se describen con más detalle en la presente. En una modalidad, la unión competitiva se ensaya por medio del uso de un ensayo de competencia de epítopos como se describe en la presente descripción. Un miembro de unión de la presente invención puede comprender un sitio de unión anticuerpo antígeno que compite con una molécula de anticuerpo, por ejemplo especialmente una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH y/o VL, CDR por ejemplo HCDR3 o conjunto de CDRs del anticuerpo parental o cualquiera de los anticuerpos 1 al 16 por la unión a la IL-17. Aspectos de la invención proporcionan miembros de unión que compiten por la unión a la IL-17 con cualquier miembro de unión definido en la presente descripción, por ejemplo compiten con el anticuerpo parental o cualquiera de los anticuerpos 2 al 16, por ejemplo en formato scFv o IgG1. Un miembro de unión que compite por la unión a la IL-17 con cualquier miembro de unión definido en la presente descripción puede tener una cualquiera o más de las propiedades estructurales y/o funcionales descritas en la presente descripción para miembros de unión de la invención.

55 En aspectos adicionales, la invención proporciona un ácido nucleico aislado el cual comprende una secuencia que codifica un miembro de unión, dominio VH y/o dominio VL de acuerdo a la presente invención, y métodos para preparar un miembro de unión, un dominio VH y/o un dominio VL de la invención, el cual comprende expresar dicho ácido nucleico bajo condiciones para provocar la producción de dicho miembro de unión, dominio VH y/o dominio VL, y recuperarlo.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un ácido nucleico, generalmente aislado, que codifica una secuencia de VH CDR o VL CDR descrita en la presente descripción.

5 Un aspecto adicional proporciona una célula huésped que contiene o se transforma con el ácido nucleico de la invención.

Otros aspectos de la presente invención proporcionan composiciones que contienen los miembros de unión de la invención, y su uso en métodos de inhibición y/o neutralización de la IL-17, se incluyen los métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

10 Los miembros de unión de acuerdo con la invención se pueden usar en un método de tratamiento o diagnóstico del cuerpo humano o animal, tal como un método de tratamiento (que puede incluir el tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en un paciente humano el cual comprende la administración a dicho paciente de una cantidad efectiva de un miembro de unión de la invención. Las condiciones tratables de acuerdo con la presente invención incluyen cualquiera en la cual la IL-17 juega un papel, como se discute en detalle en otro lugar en la presente descripción.

15 Estos y otros aspectos de la invención se describen con más detalle más abajo.

20 Terminología

Es conveniente señalar aquí que "y/o" donde se usa en la presente descripción se debe tomar como la descripción específica de cada una de las dos características específicas o componentes con o sin el otro. Por ejemplo "A y/o B" se debe tomar como la divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, tal como si cada uno se expusiese de forma individual en este documento.

25 *IL-17*

IL-17, o IL-17A, es interleucina-17. Las referencias a la IL-17 son normalmente a la IL-17A humana a menos que se indique de otra forma.

30 La IL-17A se expresa *in vivo* con un péptido señal N-terminal de 23 aminoácidos, el cual es escinde para producir la IL-17A madura. Una secuencia de la IL-17A humana madura silvestre es sec. con núm. de ident.: 198.

35 Es convencional referirse a los residuos de aminoácidos en la IL-17 de acuerdo a la numeración de los residuos de la secuencia madura, sin péptido señal. La numeración de los residuos de la IL-17 humana en la presente descripción se refiere a la secuencia madura sec. con núm. de ident.: 198 a menos que se indique de otra manera. El residuo 1 de la IL-17A madura es Gly, el cual está en la posición 24 del polipéptido de longitud completa.

40 Una secuencia de la IL-17 humana se depositó bajo el número de acceso Q16552 (Swiss-Prot), el cual muestra el precursor de longitud completa de la IL-17A lo que incluye el péptido señal.

Una secuencia de IL-17 de cinomolgo se muestra como sec. con núm. de ident.: 162, codificada por la sec. con núm. de ident.: 161.

45 Como se describe en la presente descripción en otro lugar, la IL-17A puede ser recombinante, y/o puede ser glicosilada o no glicosilada. La IL-17A se expresa naturalmente *in vivo* en forma glicosilada N-enlazada. La IL-17A glicosilada puede además expresarse en sistemas recombinantes, por ejemplo en células HEK EBNA. La IL-17A se puede expresar en forma no-glicosilada en células de *E. coli*.

50 *Miembro de unión*

55 Este describe un miembro de unión de un par de moléculas que se unen unen entre sí. Los miembros de un par de unión pueden ser de origen natural o producidos sintéticamente total o parcialmente. Un miembro del par de moléculas tiene un área en su superficie, o una cavidad, que se une a y por lo tanto es complementaria a una organización espacial y polar particular del otro miembro del par de moléculas. Ejemplos de tipos de pares de unión son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de la hormona, receptor-ligando, enzima-sustrato. La presente invención se refiere a las reacciones del tipo antígeno-anticuerpo. Un miembro de unión normalmente comprende una molécula que tiene un sitio de unión al antígeno. Por ejemplo, un miembro de unión puede ser una molécula de anticuerpo o una proteína no-anticuerpo que comprende un sitio de unión al antígeno.

Un sitio de unión al antígeno se puede proporcionar por medio de arreglos de CDRs en andamios de proteínas no-anticuerpo tales como fibronectina o citocromo B etc. (Haan & Maggos, 2004; Koide 1998; Nygren 1997), o por aleatorizar o mutar residuos de aminoácidos de un bucle de un andamio de proteína para conferir especificidad de unión por el objetivo deseado. Los andamios para la ingeniería de nuevos sitios de unión en las proteínas se revisaron en detalle por Nygren y otros (1997). Los andamios de proteína para los mimetizadores del anticuerpo se describen en WO/0034784, que se incorpora como referencia en la presente descripción en su totalidad, en las que los inventores describen las proteínas (mimetizadores del anticuerpo) que incluyen un dominio tipo III de fibronectina que tiene al menos un lazo aleatorio. Un andamio adecuado en cual injertar uno o más CDR, por ejemplo, un conjunto de las HCDR, o una HCDR y/o LCDR3, se puede proporcionar por cualquier miembro del dominio de la superfamilia de genes de las inmunoglobulinas. El andamio podría ser una proteína humana o no humana. Una ventaja del andamio proteico que no es anticuerpo es que podría proporcionar un sitio de unión al antígeno en una molécula andamio que es más pequeña y/o más fácil de fabricar que al menos algunas moléculas del anticuerpo. El tamaño pequeño de un miembro de unión puede conferir propiedades fisiológicas útiles, tales como una capacidad para entrar en las células, penetrar profundo en los tejidos o alcanzar los objetivos dentro de otras estructuras o para unirse dentro de las cavidades proteicas del antígeno objetivo. El uso de los sitios de unión del antígeno en los andamios proteicos que no son anticuerpo se revisa en Wess, 2004. Típicas son las proteínas que tienen un andamio estable y uno o más lazos variables, en los que la secuencia de aminoácidos del lazo o lazos se muta de forma específica o al azar para crear un sitio de unión al antígeno que se une al antígeno objetivo. Tales proteínas incluyen el dominio de unión de IgG de la proteína A de *S. aureus*, transferrina, tetranectina, fibronectina (por ejemplo, el dominio 10mo de la fibronectina tipo III) y lipocalinas. Otros enfoques incluyen "Microcuerpos" sintéticos (Selecore GmbH), los cuales se basan en ciclótidos - pequeñas moléculas que tienen enlaces disulfuro intra-moleculares.

Además de las secuencias de anticuerpo y/o un sitio de unión al antígeno, un miembro de unión de acuerdo con la presente invención puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, para formar un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o conferir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad para unirse al antígeno. Los miembros de unión de la invención pueden portar una etiqueta detectable, o se pueden conjugar con una toxina o una enzima o porción identificada (por ejemplo, a través de un enlazador o enlace peptídil). Por ejemplo, un miembro de unión puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio enzimático) así como un sitio de unión al antígeno, en donde el sitio de unión al antígeno se une al antígeno y de esta forma dirige el sitio catalítico al antígeno. El sitio catalítico podría inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo, por escisión.

Aunque, como se indica, los andamios que no son de anticuerpo pueden portar CDR, la estructura para portar una CDR, por ejemplo una CDR3, o un conjunto de CDR de la invención, por lo general, será una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o una parte sustancial de la misma en la que la CDR o un conjunto de las CDR se encuentra en una ubicación que corresponde a la CDR o conjunto de CDR de origen natural en los dominios variables VH y VL de anticuerpos codificados por los genes de las inmunoglobulinas reordenadas. Las estructuras y las ubicaciones de los dominios variables de las inmunoglobulinas se pueden determinar por referencia a Kabat y otros 1987, y las actualizaciones del mismo, ahora disponible en la Internet (en immuno.bme.nwu.edu o encontrar "Kabat" por medio del uso de cualquier buscador).

La región CDR o CDR, se pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas según la definición de Kabat y otros, (Kabat 1991a, y ediciones posteriores). Un anticuerpo contiene normalmente 3 regiones CDR de cadena pesada y 3 regiones CDR de cadena ligera. El término CDR o las CDR se usa aquí para indicar, de acuerdo con el caso, una de estas regiones o varias, o incluso la totalidad, de estas regiones que contienen la mayoría de los residuos de aminoácidos responsables de la unión por afinidad de los anticuerpo por el antígeno o el epítipo que reconoce.

Entre las seis secuencias CDR cortas, la tercera CDR de la cadena pesada (HCDR3) tiene una mayor variabilidad de tamaño (mayor diversidad en esencia debido a los mecanismos de arreglo de los genes que dan lugar a la misma). Puede ser tan corto como 2 aminoácidos aunque el mayor tamaño conocido es 26. Funcionalmente, la HCDR3 juega un papel en parte en la determinación de la especificidad del anticuerpo (Segal 1974; Amit 1986; Chothia 1987; Chothia 1989; Caton 1990; Sharon 1990a; Sharon 1990b; Kabat y otros, 1991b).

HCDR1 puede ser de una longitud de 5 aminoácidos, consistente de los residuos de Kabat 31-35. HCDR2 puede ser de una longitud de 17 aminoácidos, consistente de los residuos de Kabat 50-65. HCDR3 puede ser de una longitud de 9 aminoácidos, consistente de los residuos de Kabat 95-102. LCDR1 puede ser de una longitud de 13 aminoácidos, consistente de los residuos de Kabat 24-34. LCDR2 puede ser de una longitud de 7 aminoácidos, consistente de los residuos de Kabat 50-56. LCDR3 puede ser de una longitud de 9 aminoácidos, consistente de los residuos de Kabat 89-97.

Molécula de anticuerpo

Este describe una inmunoglobulina tanto natural o producida total o parcialmente de forma sintética. El término además cubre cualquier polipéptido o proteína que comprende un sitio de unión antígeno-anticuerpo. Se debe entender aquí que la invención no se relaciona a los anticuerpos en forma natural, lo que es decir que ellos no están en su ambiente natural sino que fue posible aislarlos u obtenerlos por purificación a partir de fuentes naturales, o de otra forma obtenerlos por recombinación genética, o por síntesis química, y que ellos pueden contener aminoácidos no naturales como se describirá más tarde. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión antígeno-anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, moléculas tales como Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd; y diacuerpos.

Las moléculas de anticuerpo de la invención pueden ser IgG, por ejemplo IgG1.

Es posible tomar monoclonales y otros anticuerpos y usar técnicas de la tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que se unen al antígeno diana. Estas técnicas pueden implicar la introducción de ADN de codificación para la región variable de inmunoglobulina, o los CDRs, de un anticuerpo a las regiones constantes, o regiones constantes más regiones de marco, de una inmunoglobulina diferente. Ver, por ejemplo, EP-A-239400, GB 2188638A o EP-A-184187, y un gran cuerpo de literatura posterior. Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo pueden estar sujetas a mutación genética u otros cambios, que pueden o no alterar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

Como los anticuerpos se pueden modificar en un número de formas, el término "molécula de anticuerpo" debe interpretarse que cubre cualquier miembro de unión o sustancia que tiene un sitio de unión anticuerpo antígeno con la requerida especificidad y/o unión al antígeno. Así, este término cubre fragmentos de anticuerpos y derivados, que incluyen cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión antígeno-anticuerpo, tanto natural o total o parcialmente sintético. Las moléculas quiméricas que comprenden un sitio de unión antígeno-anticuerpo, o equivalente, fundido a otro polipéptido (por ejemplo, que se deriva de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo), se encuentran por lo tanto incluidas. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en EP-A-0120694 y EP-A-0125023, y un gran cuerpo de literatura posterior.

Otras técnicas disponibles en la materia de ingeniería de anticuerpos permitieron aislar anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, se pueden hacer hibridomas humanos según lo descrito por Kontermann & Dubel (2001). La exposición en fagos, otra técnica establecida para generar miembros de unión se describió en detalle en muchas publicaciones tales como WO92/01047 (discutidas más aun más abajo) y las patentes de los Estados Unidos US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160, US6521404 y Kontermann & Dubel (2001). Los ratones transgénicos en los que los genes de anticuerpos de ratón se inactivan y se sustituyen funcionalmente con genes de anticuerpos humanos mientras deja intactos otros componentes del sistema inmune del ratón, se pueden usar para aislar anticuerpos humanos (Mendez 1997).

Las moléculas sintéticas de anticuerpos se pueden crear por la expresión de genes generados por medio de oligonucleótidos sintetizados y ensamblados en vectores de expresión adecuados, por ejemplo según lo descrito por Knappik y otros (2000) o Krebs y otros (2001).

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo puede realizar la función de unión a los antígenos. Los ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab consistente de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd consistente de los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv consistente de los dominios VL y VH de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward 1989; McCafferty 1990; Holt 2003), que consiste de un dominio VH o un dominio VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) moléculas Fv de cadena simple (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL se unen por un enlazador péptido que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird 1988; Huston 1988); (viii) dímeros Fv biespecíficos de cadena simple (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica (WO94/13804 Holliger 1993a). Las moléculas Fv, scFv o diacuerpo pueden estabilizarse por la incorporación de puentes de disulfuro que enlazan los dominios VH y VL (Reiter 1996). Los minicuerpos que comprende un scFv unido a un dominio CH3 se pueden preparar además (Hu 1996). Otros ejemplos de fragmentos de unión son el Fab', que difiere de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el terminal carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada, que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo, y el Fab'-SH, que es un fragmento Fab' en el cual el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes porta(n) un grupo tiol libre.

Fragmentos de anticuerpos de la invención se pueden obtener a partir de cualquier molécula de anticuerpo descrita en la presente descripción, por ejemplo moléculas de anticuerpo que comprenden dominios VH y/o VL o CDRs de cualquiera de los anticuerpos 1 al 16, por métodos tales como digestión por enzimas, tales como pepsina o papaína y/o por escisión de los puentes disulfuro por reducción química.

De otra manera, los fragmentos de anticuerpo comprendidos en la presente invención se pueden obtener mediante técnicas de recombinación genética también conocidas para la persona con experiencia en la materia o bien por la síntesis de péptidos a través de, por ejemplo, sintetizadores de péptidos automáticos, tales como los suministrados por la empresa Applied Biosystems, o por la síntesis y expresión de ácidos nucleicos.

Los fragmentos de anticuerpos funcionales de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier fragmento funcional cuya vida media se incrementa por una modificación química, especialmente por PEGilación, o por incorporación en un liposoma.

Un dAb (anticuerpo de dominio) es un pequeño fragmento monomérico de unión al antígeno de un anticuerpo, a saber la región variable de una cadena pesada o ligera de anticuerpo (Holt 2003). Los VH dAbs se producen de forma natural en los camélidos (por ejemplo, el camello, la llama) y se pueden producir por inmunización de un camélido con un antígeno diana, el aislamiento de células B específicas para el antígeno y la clonación directa de los genes de los dAb a partir de células B individuales. Los dAbs además se producen en cultivo celular. Su pequeño tamaño, buena solubilidad y estabilidad a la temperatura los hace particularmente útiles desde el punto de vista fisiológico, y adecuados para la selección y maduración de la afinidad. Un miembro de unión de la presente invención puede ser un dAb que comprende un dominio VH o VL sustancialmente según se establece en la presente, o un dominio VH o VL que comprende un conjunto de CDR sustancialmente según se establece en la presente.

Como se usa en la presente, la frase "sustancialmente tal como se establece" se refiere a que la(s) característica(s) de las CDR pertinentes del dominio VH o VL de los miembros de unión descritos en la presente serán idénticas o muy similares a las regiones determinadas de las cuales se establece la secuencia. Como se describe en la presente, la frase "muy similar" con respecto a la región determinada (s) de uno o más dominios variables, se contempla que de 1 a aproximadamente 5, por ejemplo, de 1 a 4, que incluye 1 a 3, o 1 ó 2, o 3 ó 4, sustituciones de aminoácidos se pueden hacer en el CDR y/o dominio VH o VL.

Anticuerpos biespecíficos o bifuncionales forman una segunda generación de anticuerpos monoclonales en la cual dos regiones variables diferentes se combinan en la misma molécula (Holliger 1999). Su uso se demostró en el campo del diagnóstico y en el campo de la terapia a partir de su capacidad para adquirir nuevas funciones efectoras o dirigirse a varias moléculas en la superficie de células tumorales. Cuando los anticuerpos biespecíficos se van a usar, estos anticuerpos pueden ser biespecíficos convencionales que se pueden fabricar en una variedad de formas (Holliger 1993b), por ejemplo, preparados químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o puede ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpos biespecíficos que se mencionaron anteriormente. Estos anticuerpos se pueden obtener por métodos químicos (Glennie 1987; Repp 1995) o métodos somáticos (Staerz 1986; Suresh 1986) pero de igual forma por técnicas de ingeniería genética las cuales permiten forzar la heterodimerización y así facilitar el proceso de purificación del anticuerpo buscado (Merchand 1998). Ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen los de la tecnología BiTE™ en la cual los dominios de unión de dos anticuerpos con diferente especificidad se pueden usar y enlazar directamente a través de péptidos cortos flexibles. Esta combina dos anticuerpos en una única cadena polipeptídica corta. Los diacuerpos y los scFv se pueden construir sin región Fc, por medio de uso solamente de dominios variables, lo que podría reducir los efectos de la reacción anti-idiotipo.

Los anticuerpos biespecíficos se pueden construir como IgG completa, como Fab'2 biespecíficos, como Fab'PEG, como diacuerpos o bien como scFv biespecíficos. Además, dos anticuerpos biespecíficos se pueden unir mediante el uso de los métodos rutinarios que se conocen en la materia para formar anticuerpos tetravalentes.

Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos completos biespecíficos, además pueden ser particularmente útiles, ya que se pueden construir fácilmente y expresar en E. coli. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpos) de especificidades de unión adecuadas, se pueden seleccionar fácilmente mediante el uso de una exposición en fagos (WO94/13804) a partir de genotecas. Si uno de los brazos del diacuerpo se mantiene constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra el IL-17, a continuación, se puede hacer una genoteca, donde el otro brazo es muy variado y se selecciona un anticuerpo de apropiada especificidad. Anticuerpos completos biespecíficos se pueden hacer por métodos de ingeniería alternativos como se describe en Ridgeway 1996.

Varios métodos están disponibles en la materia para obtener anticuerpos contra la IL-17. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, especialmente de origen humano, de ratón, quimérico o humanizado, los cuales se pueden obtener de acuerdo con los métodos estándar bien conocidos por la persona con experiencia en la materia.

En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, especialmente de origen murino, es posible referirse a las técnicas que se describen en particular en el manual de "anticuerpos" (Harlow y Lane 1988) o a la técnica de preparación de hibridomas descrita por Kohler y Milstein, 1975[].

Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener, por ejemplo, de una célula de un animal inmunizado contra la IL-17, o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales. La IL-17, o uno de sus fragmentos, se puede producir especialmente de acuerdo con los métodos habituales de trabajo, mediante la recombinación genética a partir de una secuencia de ácido nucleico contenida en la secuencia de ADNc de codificación para IL-17 o fragmento de la misma, por síntesis de péptidos a partir de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia del péptido de la IL-17 y/o fragmento de la misma. Los anticuerpos monoclonales se pueden, por ejemplo, purificar en una columna de afinidad en la que se inmoviliza previamente la IL-17 o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo que reconocen dichos anticuerpos monoclonales. Más concretamente, los anticuerpos monoclonales se pueden purificar por cromatografía en la proteína A y/o G, seguido o no seguido por cromatografía de intercambio iónico para eliminar los contaminantes de proteínas residuales, así como el ADN y el LPS, en sí mismo, seguido o no seguido por cromatografía de exclusión en gel de Sepharose con el fin de eliminar los posibles agregados debido a la presencia de dímeros o de otros multímeros. En una modalidad, el conjunto de estas técnicas se puede usar simultáneamente o sucesivamente.

Sitio de unión al antígeno

Este describe la parte de la molécula que se une a y es complementaria a todo o a parte del antígeno diana. En una molécula de anticuerpo este se conoce como el sitio de unión antígeno-anticuerpo, y comprende la parte del anticuerpo que se une y complementa a la totalidad o parte del antígeno diana. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo sólo se puede unir a una parte específica del antígeno, cuya parte se denomina epítipo. Uno o más dominios variables de anticuerpos pueden proporcionar un sitio de unión antígeno-anticuerpo. Un sitio de unión antígeno-anticuerpo puede comprender una región variable de cadena ligera de anticuerpo (VL) y una región variable de cadena pesada de anticuerpo (VH).

Aislado

[0170] Esto se refiere al estado en el cual los miembros de unión de la invención, o ácido nucleico de codificación de dichos miembros de unión, estarán por lo general de conformidad con la presente invención. Por lo tanto, los miembros de unión, los dominios VH y/o VL, y las moléculas de ácido nucleico de codificación y los vectores de acuerdo con la presente invención se pueden proporcionar aislados y/o puros, por ejemplo, de su entorno natural, en forma sustancialmente pura o homogénea, o, en el caso del ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácidos nucleicos o genes de origen que no sea la secuencia de codificación del polipéptido con la función deseada. Miembros aislados y el ácido nucleico aislado serán libres o sustancialmente libres del material con el cual se asocian normalmente tal como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los cuales ellos se hallan en su ambiente natural, o el ambiente en el cual se prepararan (por ejemplo cultivos de células) cuando tal preparación es por tecnología de ADN recombinante que se practica *in vitro* o *in vivo*. Los miembros y el ácido nucleico se pueden formular con diluentes o adyuvantes y todavía para propósitos prácticos aislarse - por ejemplo los miembros normalmente se mezclarán con gelatina o vehículos si se usan para recubrir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclarán con vehículos farmacéuticamente aceptables o diluentes cuando se usan en diagnóstico o terapia. Los miembros de la unión pueden ser glucosilados, ya sea natural o mediante sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NS0 (ECACC 85110503), o pueden ser (por ejemplo si se producen por la expresión en una célula procarionta) no glicosilado.

Las preparaciones heterogéneas que comprenden moléculas de anticuerpos anti IL-17 también forman parte de la invención. Por ejemplo, estas preparaciones pueden ser mezclas de anticuerpos de cadenas pesadas de longitud completa y cadenas pesadas que carecen de la lisina terminal C, con distintos grados de glicosilación y/o con aminoácidos derivatizados, tales como la ciclación de un ácido glutámico N-terminal para formar un residuo ácido piroglutámico.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Secuencia de aminoácidos de la IL-17A humana etiquetada N-terminalmente (sec. con núm. de ident.: 197). Los residuos N-terminales etiquetados 1 al 21 se muestran subrayados. Los residuos 92-108, que corresponden a los residuos 71-87 de la IL-17A humana madura, están en recuadro (sec. con núm. de ident.: 199).

Figura 2. La secuencia de aminoácidos precursora de longitud completa de la IL-17A humana con etiqueta His5 C-terminal (sec. con núm. de ident.: 200). El péptido señal N-terminal de 23 residuos de aminoácidos se muestra subrayado. Los residuos mutados de la IL-17A humana silvestre (sec. con núm. de ident.: 198) están en negrita y subrayados, en la secuencia en recuadro sec. con núm. de ident.: 199 que corresponde a los residuos 71-87 de la IL-17A humana madura. La IL-17A humana madura mutante, sin péptido N-terminal y etiqueta con His, es sec. con núm. de ident.: 201.

Descripción detallada de la invención

5 Como se señaló anteriormente, un miembro de unión de acuerdo con la presente invención modula y puede neutralizar una actividad biológica de la IL-17. Como se describe en la presente descripción, miembros de unión a la IL-17 de la presente invención se pueden optimizar por potencia de neutralización. En general, la optimización de la potencia implica la mutación de la secuencia de un miembro de unión que se selecciona (normalmente la secuencia del dominio variable de un anticuerpo) para generar una genoteca de miembros de unión, que luego son analizados para la potencia y se seleccionan los miembros de unión más potentes. Así, los miembros de unión que se seleccionan por "potencia optimizada" tienden a tener una potencia mayor que los miembros de unión de los que se generó la genoteca. Sin embargo, los miembros de unión de alta potencia también se pueden obtener sin optimización, por ejemplo, un miembro de unión de alta potencia se puede obtener directamente de una selección inicial, por ejemplo, un ensayo bioquímico de neutralización. Un miembro de unión con "potencia optimizada" refiere a un miembro de unión con una potencia optimizada de neutralización de una actividad particular o función corriente abajo de la IL-17. Los ensayos y las potencias se describen con más detalle en la presente. La presente invención proporciona miembros de unión tanto de potencia optimizada y no optimizada, así como métodos para la optimización de la potencia de un miembro de unión seleccionado. La presente invención permite a la persona con experiencia generar miembros de unión con alta potencia.

10 A pesar de que la optimización de la potencia se puede usar para generar una mayor potencia de los miembros de unión de un miembro de unión determinado, se señala también que los miembros de unión de alta potencia se pueden obtener incluso sin optimización de la potencia.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para obtener uno o más miembros de unión capaces de unirse al antígeno, el método, incluye poner en contacto una genoteca de los miembros de unión de acuerdo con la invención y dicho antígeno, y la selección de uno o más miembros de unión de la genoteca capaces de unirse a dicho antígeno.

25 La genoteca se puede exhibir en partículas o complejos moleculares, por ejemplo, paquetes genéticos replicables, tales como levadura, bacterias o partículas bacteriófagos (por ejemplo, T7), virus, células o covalentes, ribosomal o de otro tipo en los sistemas de exposición *in vitro*, cada partícula o complejo molecular que contiene el ácido nucleico de codificación del dominio variable VH del anticuerpo que se expone en ella, y opcionalmente también un dominio VL exhibido si está presente. La exhibición de fagos se describe en WO92/0104 y por ejemplo las patentes de Estados Unidos US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160 y US6521404, cada una de las cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

30 Después de la selección de los miembros de unión capaces de unirse al antígeno y que se exhiben en el bacteriófago otra genoteca de partículas o complejos moleculares, el ácido nucleico se puede tomar de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que exhibe un dicho miembro de unión seleccionado. Estos ácidos nucleicos se pueden usar en la producción posterior de un miembro de unión o un dominio variable VH y VL de anticuerpo mediante la expresión del ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico que se tomó de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que muestra dicho miembro de unión seleccionado.

35 Un dominio variable VH de un anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de un dominio variable VH de un anticuerpo del miembro de unión seleccionado, se puede proporcionar en forma aislada, como un miembro de unión que comprende tal dominio VH.

40 La habilidad de unir IL-17 se puede evaluar más aun, además la habilidad de competir con por ejemplo una molécula de anticuerpo parental o una molécula de anticuerpo 1 al 16 (por ejemplo en formato scFv y/o formato IgG, por ejemplo IgG1) por la unión a la IL-17. La habilidad de neutralizar la IL-17 se puede evaluar, como se discute más aun en otro lugar en la presente descripción.

45 Un miembro de unión de acuerdo a la presente invención puede unir IL-17 con la afinidad de uno de los anticuerpos del 1 al 16 por ejemplo en formato scFv o IgG, o con una afinidad que es mejor.

50 Un miembro de unión de acuerdo a la presente invención puede neutralizar una actividad biológica de la IL-17 con la potencia de uno de los anticuerpos del 1 al 16 por ejemplo en formato scFv o IgG1, o con una potencia que es mejor.

55 La afinidad de unión y la potencia de neutralización de los diferentes miembros de unión se pueden comparar en condiciones adecuadas.

60 Las variantes de las moléculas de anticuerpos divulgadas en este documento se podrían producir y usa en la presente

invención. Siguiendo la guía de la química computacional en aplicar técnicas de análisis de datos multivariados a las relaciones estructura/propiedad-actividad (Wold 1984) las relaciones cuantitativas actividad-propiedad de los anticuerpos se pueden derivar por medio del uso de técnicas matemáticas bien-conocidas tales como la regresión estadística, reconocimiento de patrones y clasificación (Norman 1998; Kandel & Backer 1995; Krzanowski 2000; Witten & Frank 1999; Denison (Ed) 2002; Ghose & Viswanadhan). Las propiedades de los anticuerpos se pueden obtener a partir de modelos empíricos y modelos teóricos (por ejemplo, el análisis de residuos de contacto probables o la propiedad fisicoquímica calculada) de la secuencia del anticuerpo, las estructuras funcional y tridimensional y estas propiedades se pueden considerar individualmente y en conjunto.

Un sitio del anticuerpo de unión al antígeno compuesto de un dominio VH y un dominio VL se forma normalmente por seis lazos del polipéptido: tres del dominio variable de cadena ligera (VL) y tres del dominio variable de cadena pesada (VH). El análisis de los anticuerpos de estructura atómica conocida ha aclarado las relaciones entre la secuencia y la estructura tridimensional de sitios de combinación del anticuerpo (Chothia 1992; Al-Lazikani 1997). Estas relaciones implican que, excepto para la tercera región (lazo) en los dominios VH, los lazos del sitio de unión tienen una de un pequeño número de conformaciones de la cadena principal: estructuras canónicas. Se ha demostrado que la estructura canónica formada en un lazo en particular está determinada por su tamaño y la presencia de determinados residuos en sitios claves tanto en el lazo como en las regiones marco (Chothia 1992; Al-Lazikani 1997).

Este estudio de la relación secuencia-estructura se puede usar para la predicción de aquellos residuos en un anticuerpo de secuencia conocida, pero de una estructura tridimensional desconocida, los cuales son importantes en el mantenimiento de la estructura tridimensional de sus lazos CDR y por lo tanto mantiene la especificidad de unión. Estas predicciones se pueden respaldar a diferencia de las predicciones para el resultado de los experimentos de optimización conducidos. En un enfoque estructural, se puede crear un modelo de la molécula de anticuerpo (Chothia 1986) por medio del uso del cualquier paquete libremente disponible o comercial tal como WAM (Whitelegg & Rees 2000). Un paquete de software de visualización y análisis de proteína tal como Insight II (Accelrys, Inc) o Deep View (Guex & Peitsch 1997) se pueden usar después para evaluar posibles sustituciones en cada posición en la CDR. Esta información se podría usar después para generar sustituciones que probablemente tengan un efecto mínimo o beneficioso en la actividad .

Las técnicas que se requieren para generar las sustituciones en las secuencias de aminoácidos de las CDR, los dominios VH o VL del anticuerpo y los miembros de unión generalmente están disponibles en la materia. Se pueden hacer variantes de secuencias, con sustituciones que se pueden o no predecir que tendrán un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad, y probar la capacidad para unirse y/o neutralizar la IL-17 y/o cualquier otra propiedad que se desee.

Las variantes de la secuencia de aminoácido del dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL cuyas secuencias se describen específicamente en la presente se pueden emplear de acuerdo con la presente invención, según se discutió. Variantes particulares pueden incluir una o más alteraciones de la secuencia de aminoácidos (adición, delección, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido), puede ser menor que aproximadamente 20 alteraciones, menor que aproximadamente 15 alteraciones, menor que aproximadamente 10 alteraciones o menor que aproximadamente 5 alteraciones, tal vez 5, 4, 3, 2 ó 1. Las alteraciones se pueden realizar en una o más regiones de marco y/o en una o más CDR. Las alteraciones normalmente no resultan en una pérdida de las funciones, así que un miembro de unión que comprende una secuencia de aminoácidos así alterada puede retener una habilidad de unir y/o neutralizar la IL-17. Por ejemplo, puede retener la misma habilidad de unión y/o neutralización cuantitativa que un miembro de unión en el cual no se hizo alteración, por ejemplo como se mide en un ensayo descrito en la presente descripción. El miembro de unión que comprende una secuencia de aminoácidos alterada así, puede tener una mejor capacidad de unir y/o neutralizar la IL-17.

La alteración puede comprender la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos con un aminoácido que no es de origen natural o estándar, la modificación de uno o más residuos de aminoácidos en una forma que no es de origen natural o estándar, o la inserción en la secuencia de uno o más aminoácidos que no es de origen natural o estándar. Los números y ubicaciones ilustrativos de las alteraciones preferidas en las secuencias de la invención se describen en otro lugar en la presente. Los aminoácidos naturales incluyen los 20 L-aminoácidos "estándares" identificados como G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E por sus códigos estándares de una sola letra. Los aminoácidos no estándar incluyen todos los residuos que se puedan incorporar en un andamio de polipéptido o resultar de la modificación de un residuo de aminoácido existente. Los aminoácidos no estándar pueden ser de origen natural o pueden no ser de origen natural. Muchos aminoácidos no estándar de origen natural se conocen en la materia, tales como 4-hidroxiprolina, 5-hidroxilisina, 3-metilhistidina, N-acetilserina, etc. (Voet & Voet 1995). Aquellos residuos de aminoácido que son derivatizados en su posición N-alfa se localizarán solamente en el terminal N de una secuencia de aminoácido. Normalmente en la presente invención un aminoácido es un L-aminoácido, pero en algunas modalidades puede ser un D-aminoácido. La alteración, por lo tanto, puede comprender la modificación de un L-aminoácido en, o la sustitución por, un D-aminoácido. Las formas metilada, acetilada y/o fosforilada de aminoácidos también se conocen, y los aminoácidos en la presente invención pueden ser objeto de tal modificación.

5 Las secuencias de aminoácidos en los dominios de anticuerpos y miembros de unión de la invención pueden comprender aminoácidos no naturales o no estándar descritos anteriormente. En algunas modalidades los aminoácidos no estándar (por ejemplo, D-aminoácidos) se pueden incorporar en una secuencia de aminoácidos durante la síntesis, mientras que en otras modalidades los aminoácidos no estándar se pueden introducir por modificación o sustitución del aminoácido "original" estándar después de la síntesis de la secuencia de aminoácido.

10 El uso de aminoácidos no estándar y/o no naturales aumenta la diversidad estructural y funcional, y en consecuencia, aumenta las posibilidades de lograr la unión a la IL-17 y la neutralización de las propiedades deseadas de un miembro de unión de la invención. Además, se demostró que los D-aminoácidos y sus análogos tienen mejores perfiles farmacocinéticos en comparación con los L-aminoácidos estándares, debido a la degradación *in vivo* de polipéptidos que tienen L-aminoácidos después de la administración a un animal, por ejemplo, un humano.

15 Nuevas regiones VH y VL que portan secuencias derivadas de las CDR de la invención se pueden obtener mediante mutagénesis al azar de uno o más genes VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones en el dominio variable entero. Esta técnica es descrita por Gram y otros (1992), quien usó la PCR propensa a errores. En algunas modalidades una o dos sustituciones de aminoácidos se hacen dentro de un dominio variable entero o un conjunto de CDR. Otro método que se puede usar es la mutagénesis directa a las regiones CDR de los genes VH o VL. Estas técnicas se describen por Barbas y otros (1994) y Schier y otros (1996).

20 Todas las técnicas descritas anteriormente se conocen como tales en la materia y la persona con experiencia será capaz de usar dichas técnicas para proporcionar los miembros de unión de la invención, mediante el uso de la metodología habitual en la materia.

25 Otro aspecto de la invención proporciona un método para obtener un sitio de unión antígeno-anticuerpo para la IL-17, el método comprende proporcionar a través de la adición, supresión, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH establecido en la presente, un dominio VH que es una variante de la secuencia de aminoácidos del dominio VH, combinando opcionalmente el dominio VH así proporcionado con uno o más dominios VL, y probando el dominio VH o la combinación o combinaciones VH/VL para identificar un miembro de unión o un sitio de unión antígeno-anticuerpo para el IL-17, y opcionalmente, con una o más propiedades funcionales, por ejemplo, la capacidad de neutralizar la actividad de la IL-17. Dicho dominio VL puede tener una secuencia de aminoácido que es sustancialmente como se expone en la presente descripción. Se puede emplear un método similar, en el que una o más variantes de la secuencia de un dominio VL descrito en la presente, se combinan con uno o más dominios VH.

35 Como se señaló anteriormente, una secuencia de aminoácidos de CDR sustancialmente según lo establecido en la presente, se puede portar como una CDR en un dominio variable de anticuerpo humano o una parte sustancial de éste. Las secuencias HCDR3 sustancialmente como se exponen en la presente descripción representan modalidades de la presente invención y por ejemplo cada una de estas se puede portar como una HCDR3 en un dominio variable de cadena pesada humana o una porción sustancial de la misma.

40 Los dominios variables empleados en la invención se pueden obtener o derivar de cualquier línea germinal o dominio variable humano reorganizado, o puede ser un dominio variable sintético que se basa en secuencias consenso o reales de los dominios variables humanos que se conocen. Un dominio variable se puede derivar de un anticuerpo no-humano. Una secuencia de CDR de la invención (por ejemplo CDR3) se puede introducir en un repertorio de dominios variables que carecen de un CDR (por ejemplo CDR3), mediante el uso de la tecnología del ADN recombinante. Por ejemplo, Marks y otros (1992) describen métodos para producir los repertorios de dominios variables de anticuerpos en los cuales los cebadores de consenso que se dirigen a o están adyacentes al extremo 5' del área de dominio variable se usan junto con los cebadores de consenso para la tercera región marco de genes humanos de VH para proporcionar un repertorio de dominios variables de VH que carecen de una CDR3. Marks y otros describen además cómo este repertorio puede ser combinado con una CDR3 de un anticuerpo particular. Mediante el uso de técnicas análogas, las secuencias que se derivan de la CDR3 de la presente invención se pueden mezclar con repertorios de dominios de VH y VL que carecen de una CDR3, y los dominios completos de VH o VL mezclados, se combinan con un dominio VH o VL cognado para proporcionar los miembros de unión de la invención. El repertorio después se puede expresar en un huésped adecuado tal como el sistema de exposición en fagos del WO92/01047, el cual se incorpora en la presente descripción por referencia en su totalidad, o cualquiera de un gran cuerpo de literatura subsecuente, que incluye Kay, Winter & McCafferty (1996), de forma que los miembros de unión adecuados se pueden seleccionar. Un repertorio puede consistir desde cualquiera de 10^4 miembros individuales hacia arriba, por ejemplo, al menos 10^5 , al menos 10^6 , al menos 10^7 , al menos 10^8 , al menos 10^9 o al menos 10^{10} miembros. Otros sistemas hospederos adecuados incluyen, pero no se limitan a, exposición en levadura, exposición en bacterias, exposición en T7, exposición viral, exposición celular, exposición en ribosoma y exposición covalente.

El intercambio de análogos o las técnicas combinatorias están además descritas por Stemmer (1994), quien describe la técnica en relación a un gen β -lactamasa pero observa que el enfoque se puede usar para la generación de anticuerpos.

- 5 Se proporciona un método de preparación de un miembro de unión para el antígeno IL-17, el método comprende:
- (a) proporcionar un repertorio de partida de ácidos nucleicos de codificación de un dominio VH el cual incluye una CDR3 que se sustituye o carece de una región de codificación CDR3;
 - (b) combinar dicho repertorio con un ácido nucleico donante que codifica una secuencia de aminoácidos sustancialmente según lo establecido en la presente para una VH CDR3 de tal manera que el ácido nucleico donante se inserta en la región CDR3 en el repertorio, con el fin de ofrecer un repertorio de productos de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH;
 - (c) expresar los ácidos nucleicos de dicho repertorio de productos;
 - (d) seleccionar un miembro de unión de la IL-17, y
 - (e) recuperar dicho miembro de unión o ácido nucleico de codificación del mismo.

15 Una vez más, un método análogo se puede emplear en el que un VL CDR3 de la invención se combina con un repertorio de ácidos nucleicos que codifican para un dominio VL que incluye una CDR3 que se sustituye o carecen de una región de codificación de CDR3.

20 Del mismo modo, una o más, o las tres CDR se pueden injertar en un repertorio de dominios VH o VL que luego son detectados para un miembro de unión o miembros de unión para la IL-17.

25 En una modalidad, uno o más de las HCDR1, HCDR2 y HCDR3, del parental o los anticuerpos 2 al 16, o el conjunto de HCDRs del parental o los anticuerpo 2 al 16, se pueden emplear, y/o uno o más de las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 parentales o de los anticuerpos 2 al 16 o el conjunto de LCDRs del parental o los anticuerpo 2 al 16 se pueden emplear.

Del mismo modo, otros dominios VH y VL, conjuntos de CDR y conjuntos de HCDR y/o conjuntos de LCDR descritos en la presente se pueden emplear.

30 En algunas modalidades, una parte sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR, junto con las regiones marco que intervienen. La parte puede también incluir al menos aproximadamente 50% de una o ambas, de las regiones de marco primera y cuarta donde el 50 % es el C-terminal 50% de la primera región marco y el 50% de la región N-terminal de la cuarta región marco. Los residuos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden no estar normalmente asociados con regiones de dominios variables naturales. Por ejemplo, la construcción de los miembros de unión de la presente invención hechos por técnicas de ADN recombinante pueden dar lugar a la introducción de residuos N- o C-terminales codificados por enlazadores que se introducen para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Las otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlazadores para unir los dominios variables de la invención a otras secuencias de proteínas, que incluyen las regiones constante de anticuerpos, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de diacuerpos) o etiquetas funcionales/detectables como se discutió en más detalle en la presente.

45 Aunque en algunos aspectos de la invención, los miembros de unión comprenden un par de dominios VH y VL, el dominio de unión individual que se basa en cualquiera de las secuencias de los dominios VH o VL, forman aspectos adicionales de la invención. Se sabe que los dominios individuales de inmunoglobulina, sobre todo los dominios VH, son capaces de unir los antígenos diana de una manera específica. Por ejemplo, ver la discusión de dAbs anteriormente.

50 En el caso de cualquiera de los dominios de unión individuales, estos dominios se pueden usar para detectar dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión de dos dominios capaces de unirse a la IL-17. Esto se puede lograr por métodos de detección de fagos expuestos mediante el uso del llamado doble enfoque combinatorio jerárquico como se describe en WO92/01047, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad, en los cuales se usa una colonia individual que contiene ya sea un clon de cadena H o L para infectar una genoteca completa de los clones de codificación de la otra cadena (L o H) y el miembro de unión resultante de dos cadenas se selecciona de acuerdo con las técnicas de exposición de fagos, tales como aquellas que se describen en esa referencia. Esta técnica se describe además en Marks 1992.

55 Los miembros de unión de la presente invención pueden comprender, además, las regiones constantes de anticuerpos o partes de las mismas, por ejemplo, regiones constantes de anticuerpos humanos o partes de éste. Por ejemplo, un dominio VL se puede unir en su extremo C-terminal a los dominios constantes de la cadena ligera del anticuerpo que incluyen cadenas C κ o C λ humanas, por ejemplo cadenas C λ . Del mismo modo, un miembro de unión que se basa en un dominio VH se puede unir en su extremo C-terminal a toda o parte (por ejemplo un dominio CH1) de una cadena pesada de

inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM y cualquiera de las subclases de isotipo, particularmente IgG1 e IgG4. La IgG1 es ventajosa, debido a sus funciones efectoras y facilidad de fabricación. Cualquier variante de la región constante sintética o de otro tipo que tiene estas propiedades y estabiliza las regiones variables además es útil en las modalidades de la presente invención.

5

Los miembros de unión de la invención se pueden etiquetar con una etiqueta detectable o funcional. Una etiqueta puede ser cualquier molécula que produce o se puede inducir para producir una señal, que incluye pero no se limita a fluorescentes, radioactivas, enzimas, quimioluminiscentes o fotosensibilizadores. Por lo tanto, la unión se puede detectar y/o medir mediante la detección de fluorescencia o luminiscencia, radioactividad, actividad enzimática o absorción de luz.

10

Las etiquetas adecuadas incluyen, en forma de ilustración y sin limitación, enzimas tales como la fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH") y peroxidasa de rábano picante; colorantes; fluorescentes, tales como fluoresceína, compuestos de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído, fluorescamina, fluoróforos tales como criptatos o quelatos de lantánido (Perkin Elmer y Cis Biointernational); quimioluminiscentes tales como isoluminol; sensibilizadores; coenzimas; sustratos de enzimas; radioetiquetas que incluyen pero no se limitan a ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^{32}P , ^{14}C , ^3H , ^{57}Co , ^{99}Tc y ^{75}Se y otras radioetiquetas mencionadas en la presente descripción; partículas tales como látex o partículas de carbón; sol metálico; cristalito; liposomas; células, etc., los cuales pueden etiquetarse adicionalmente con un colorante, catalizador u otro grupo detectable. Las enzimas y coenzimas adecuadas se describen en Litman, y otros, patente de Estados Unidos núm. 4,275,149, y Boguslaski, y otros, patente de Estados Unidos núm. 4,318,980, cada una de las cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. Los fluorescentes y quimioluminiscentes adecuados se describen en Litman, y otros, patente de Estados Unidos núm. 4,275,149, la cual se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. Las etiquetas incluyen además fracciones químicas, tales como biotina que se pueden detectar a través de la unión a una fracción específica detectable afin, por ejemplo, etiqueta de avidina o estreptavidina. Las etiquetas detectables se pueden unir a los anticuerpos de la invención mediante el uso de la química convencional que se conoce en la materia.

25

Hay numerosos métodos por los que la etiqueta puede producir una señal detectable por medios externos, por ejemplo, un examen visual, radiación electromagnética, calor, y reactivos químicos. La etiqueta también se puede enlazar a otro miembro de unión que une el anticuerpo de la invención, o a un soporte.

30

La etiqueta puede producir una señal directamente, y por lo tanto no se requieren componentes adicionales para producir una señal. Numerosas moléculas orgánicas, por ejemplo, los agente fluorescentes son capaces de absorber la luz ultravioleta y visible, donde la absorción de la luz transfiere energía a estas moléculas y las eleva a un estado de energía excitado. Esta energía que se absorbe, se disipa luego de la emisión de luz en una segunda longitud de onda. Esta segunda longitud de onda de emisión también puede transferir energía a una molécula etiquetada receptora, y la energía resultante se disipa de la molécula receptora por la emisión de luz, por ejemplo, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). Otras etiquetas que producen directamente una señal incluyen isótopos radioactivos y tintes.

35

Alternativamente, la etiqueta puede necesitar otros componentes para producir una señal, y el sistema de producción de la señal incluiría entonces todos los componentes necesarios para producir una señal medible, la cual puede incluir sustratos, coenzimas, potenciadores, otras enzimas, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, limpiadores, iones metálicos, y un aglutinante específico necesario para la unión de las sustancias que generan señal. Una discusión detallada de los sistemas de producción de señal adecuados se puede encontrar en Ullman, y otros, patente de Estados Unidos núm. 5,185,243, la cual se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

45

El miembro de unión, anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, pueden presentarse en la forma de un inmunoconjugado para obtener una señal detectable y/o cuantificable. Los inmunoconjugados se pueden conjugar, por ejemplo, con enzimas tales como peroxidasa, fosfatasa alcalina, alfa-D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa amilasa, anhidrasa carbónica, acetilcolinesterasa, lisozima, malato deshidrogenasa o glucosa 6-fosfato deshidrogenasa o por una molécula tal como biotina, digoxigenina o 5-bromodeoxiuridina. Las etiquetas fluorescentes pueden de igual forma conjugarse a los inmunoconjugados o a sus fragmentos funcionales de acuerdo a la invención y especialmente incluyen fluoresceína y sus derivados, fluorocromo, rodamina y sus derivados, GFP (GFP para "Proteína Verde Fluorescente"), dansil, umbeliferona, lantánido quelatos o criptatos, por ejemplo, Europium etc. Los inmunoconjugados o sus fragmentos funcionales se pueden preparar por métodos conocidos por las personas con experiencia en la materia. Se pueden acoplar a las enzimas o a marcadores fluorescentes directamente o por intermedio de un grupo espaciador o de un grupo de enlace tal como un polialdehído, como el glutaraldehído, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el ácido dietileno-triaminopentaacético (DTPA), o en presencia de agentes de acoplamiento tales como aquellos mencionados anteriormente para los conjugados terapéuticos. Los conjugados que contienen las etiquetas de tipo de fluoresceína se pueden preparar por reacción con un isotiocianato. Otros inmunoconjugados pueden de igual forma incluir etiquetas quimioluminiscentes

60

tales como luminol y los dioxetanos, etiquetas bio- luminiscentes tales como luciferasa y luciferina, o sino etiquetas radioactivas tales como yodo123, yodo125, yodo126, yodo131, yodo133, bromo77, tecnecio99m, indio111, indio 113m, galio67, galio 68, sulfuro35, fósforo32, carbón14, tritio (hydrogen3), cobalto57, selenio75, rutenio95, rutenio97, rutenio103, rutenio105, mercurio107, mercurio203, renio99m, renio 101, renio105, escandio 47, telurio 121 m, telurio122m, telurio125m, tulio 165, tulio 167, tulio 168, flúor8, itrio 199. Los métodos conocidos por una persona con experiencia en la materia existentes para el acoplamiento a los anticuerpos de los radioisótopos terapéuticos ya sea directamente o a través de un agente quelante, tal como EDTA, DTPA, que se mencionaron antes, se pueden usar para los radioelementos los cuales se pueden usar en el diagnóstico. Es de igual forma posible mencionar el etiquetado con Na[¹²⁵I] por el método de cloramina T (Hunter y Greenwood 1962) o sino con tecnecio 99m por la técnica de Crockford y otros, (patente de los Estados Unidos núm. 4,424,200, incorporada en la presente descripción por referencia en su totalidad) o unidas a través de DTPA como se describe por Hnatowich (patente de los Estados Unidos núm. 4,479,930, incorporada en la presente descripción por referencia en su totalidad). Además, los inmunoconjugados pueden incluir una fracción de toxina, tal como por ejemplo, una fracción de toxina seleccionada de un grupo de exotoxina de pseudomonas (PE o un fragmento citotóxico o mutante de la misma), toxina de la difteria un fragmento citotóxico o mutante de la misma), una toxina botulínica A a F, ricina o un fragmento citotóxico de la misma, abrina o un fragmento citotóxico de la misma, saporina o un fragmento citotóxico de la misma toxina antiviral de hierba carmín o un fragmento citotóxico de la misma y briodina 1 o un fragmento citotóxico de la misma.

La presente invención proporciona un método que comprende causar o permitir la unión de un miembro de unión como se proporciona en la presente descripción a la IL-17. Como se indicó, tal unión puede tener lugar *in vivo*, por ejemplo, después de la administración de un miembro de unión, o el ácido nucleico que codifica un miembro de unión, o puede tener lugar *in vitro*, por ejemplo en ELISA, transferencia de tipo Western, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, o ensayos basados en células o bioquímicos tal como los que se describen en la presente descripción. La invención proporciona además la medición de los niveles de antígeno directamente, mediante el empleo de un miembro de unión de acuerdo con la invención, por ejemplo, en un sistema de biosensores.

Por ejemplo, la presente invención comprende un método de detección y/o medición de la unión a la IL-17, que comprende: (i) exponer el miembro de unión a la IL-17 y (ii) detectar la unión de dicho miembro de unión a la IL-17, en donde la unión se detecta mediante cualquier método o etiqueta perceptible que se describe en la presente. Este, y cualquier otro método de detección de unión descrito en la presente, se puede interpretar directamente por la persona que realiza el método, por ejemplo, mediante la observación visual de una marca detectable. Por otra parte, este método, o cualquier otro método de detección de la unión descritos en la presente, pueden producir un informe en forma de una autorradiografía, una fotografía, una impresión de computadora, un informe de citometría de flujo, un gráfico, una tabla, un tubo de ensayo o recipiente o pocillo que contiene el resultado, o cualquier otra representación visual o física de un resultado del método.

La cantidad de unión de los miembros de unión a la IL-17 se puede determinar. La cuantificación se puede relacionar a la cantidad del antígeno en una muestra de prueba, que puede ser de interés diagnóstico. El tamizaje por la unión a la IL-17 y/o su cuantificación puede ser útil, por ejemplo, en el tamizaje de pacientes por enfermedades y trastornos asociados con la IL-17, tales como se refieren en otro lugar en la presente descripción. En una modalidad, entre otras, un método de diagnóstico de la invención comprende (i) obtener una muestra de tejido o de líquido de un sujeto, (ii) exponer dicha muestra de tejido o de líquido a uno o más miembros de unión de la presente invención, y (iii) detectar la unión a la IL-17 en comparación con una muestra de control, en donde un aumento en la cantidad de unión a la IL-17, en comparación con el control puede indicar un nivel aberrante de la expresión o actividad de la IL-17. Las muestras de tejido o líquido que se pueden probar incluyen sangre, suero, orina, material de biopsia, tumores, o cualquier tejido sospechoso de contener niveles aberrantes de IL-17. Los sujetos que se probaron y dieron positivo por niveles o actividad de IL-17 aberrantes también se pueden beneficiar de los métodos de tratamiento descritos más adelante en la presente.

Aquellos con experiencia en la materia son capaces de elegir un modo adecuado de determinación de la unión del miembro de unión a un antígeno de acuerdo con sus preferencias y conocimientos generales, a la luz de los métodos descritos en la presente.

Las reactividades de los miembros de unión en una muestra se pueden determinar por cualquier medio adecuado. Radioinmunoanálisis (RIA) es una posibilidad. El antígeno radiactivo marcado se mezcla con el antígeno no marcado (la muestra de prueba) y se permite que se unan a los miembros de unión. El antígeno unido se separa físicamente del antígeno no unido y se determina la cantidad de antígeno radioactivo que se une al miembro de unión. Mientras más antígeno haya en la muestra de prueba, menos antígeno radiactivo se une a los miembros de unión. Un ensayo de unión competitiva también se puede usar con el antígeno no radiactivo, mediante el uso del antígeno o un análogo unido a una molécula reportera. La molécula reportera puede ser un fluorocromo, fósforo o láser de colorante con características de absorción o emisión espectralmente aisladas. Los fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, Texas Red, y quelatos de lantánidos o criptatos. Los tintes cromogénicos adecuados incluyen diaminobencidina.

Otros reporteros incluyen partículas coloidales macromoleculares o material en partículas, como perlas de látex que son coloreadas, magnéticas o paramagnéticas, y agentes activos biológicamente o químicamente que pueden directa o indirectamente causar señales detectables que se observan visualmente se detectan por vía electrónica o se registran de otra manera. Estas moléculas pueden ser enzimas, que catalizan las reacciones que desarrollan, o cambian los colores o producen cambios en las propiedades eléctricas, por ejemplo. Pueden ser molecularmente excitables, de tal manera que las transiciones electrónicas entre los estados de energía resultan en espectros de absorciones o emisiones característicos. Se pueden incluir entidades químicas que se usan conjuntamente con biosensores. Se pueden emplear los sistemas de detección biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina.

Las señales generadas por los distintos conjugados de miembros de unión con reporteros se pueden usar para obtener datos cuantificables absolutos o relativos de los miembros de unión pertinentes unidos a las muestras (normal y de prueba).

Un kit que comprende un miembro de unión de acuerdo con cualquier aspecto o modalidad de la presente invención también se brinda como un aspecto de la presente invención. En el kit, el miembro de unión puede etiquetarse para permitir su reactividad en una muestra que se determinará por ejemplo, como se describe más adelante. Además, el miembro de unión puede o no conectarse a un soporte sólido. Los componentes de un kit son generalmente estériles y están en frascos u otros recipientes cerrados. Los kits se pueden emplear en análisis de diagnóstico u otros métodos para los cuales los miembros de unión son útiles. Un kit puede contener instrucciones de uso de los componentes de un método, por ejemplo, un método de acuerdo con la presente invención. Los materiales auxiliares para ayudar en o para permitir realizar este método se pueden incluir en un kit de la invención. Los materiales auxiliares incluyen un segundo miembro de unión, diferente, el cual se une al primer miembro de unión y se conjuga con una etiqueta perceptible (por ejemplo, una etiqueta fluorescente, de isótopos radiactivos o enzima). Los kits que se basan en anticuerpos pueden también comprender perlas para la realización de una inmunoprecipitación. Cada componente del kit está, por lo general, en su propio recipiente adecuado. Por lo tanto, estos kits generalmente comprenden distintos contenedores adecuados para cada miembro de unión. Además, los kits pueden comprender instrucciones para la realización del ensayo y los métodos para interpretar y analizar los datos resultantes de la ejecución del ensayo.

La presente invención también proporciona el uso de un miembro de unión como los anteriores para medir los niveles de antígeno en un ensayo de competencia, es decir, un método para medir el nivel de antígeno en una muestra mediante el empleo de un miembro de unión según lo dispuesto por la presente invención en un ensayo de competencia. Esto puede darse cuando no es necesaria la separación física del antígeno unido del no unido. La unión de la molécula reportera al miembro de unión de modo que un cambio físico u óptico se produce en la unión es una posibilidad. La molécula reportera puede directa o indirectamente generar señales detectables, que se pueden cuantificar. La unión de las moléculas reporteras puede ser directa o indirectamente, covalente, por ejemplo, a través de un enlace peptídico o no covalente. La unión a través de un enlace peptídico puede ser el resultado de la expresión recombinante de una fusión de genes de codificación para el anticuerpo y la molécula reportera.

Por ejemplo, la invención incluye un método de identificación de un compuesto de unión de la IL-17, que comprende (i) inmovilizar la IL-17 a un soporte, (ii) poner en contacto dicha IL-17 inmovilizada simultáneamente o en forma gradual con al menos un miembro de unión etiquetado o marcado de acuerdo con la invención y uno o más compuestos de unión del ensayo, sin etiqueta o sin marca, y (iii) identificar un compuesto nuevo de unión la IL-17, mediante la observación de una disminución en la cantidad de etiquetas unidas del miembro de unión etiquetado.

Un método alternativo de identificar un compuesto de unión a la IL-17 puede comprender (i) inmovilizar el miembro de unión a un soporte, (ii) poner en contacto dicho miembro de unión inmovilizado simultáneamente o por etapas con la IL-17 etiquetada y uno o más miembros de unión o compuestos de unión de la prueba no-etiquetados o no marcados, (iii) identificar un nuevo compuesto de unión a la IL-17 al observar una disminución en la cantidad de etiqueta unida de la IL-17 etiquetada.

Estos métodos se pueden realizar con alto rendimiento mediante el uso de un formato de pocillos múltiples o de matriz. Tales ensayos se pueden llevar a cabo además en solución por ejemplo como un ensayo HTRF® como se describe en el ejemplo 2. Ver, por ejemplo, U.S. 5,814,468, la cual se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. Como se describió anteriormente, la detección de unión se puede interpretar directamente por la persona que realiza el método, por ejemplo mediante la observación visual de una marca detectable o una disminución en la presencia de la misma. Por otra parte, los métodos de unión de la invención pueden producir un informe en forma de una autorradiografía, una fotografía, una impresión de computadora, un informe de citometría de flujo, un gráfico, una tabla, un tubo de ensayo o recipiente o pocillo que contiene el resultado, o cualquier otra representación visual o física de un resultado del método.

Los ensayos de competencia además se pueden usar en el mapeo epitópico. En un caso el mapeo epitópico se puede usar

para identificar el epítipo unido por un miembro de unión de la IL-17 el cual opcionalmente puede tener características de neutralización y/o modulación optimizadas. Tal epítipo puede ser lineal o conformacional. Un epítipo conformacional puede comprender al menos dos fragmentos diferentes de IL-17, en donde dichos fragmentos están posicionados próximos uno al otro cuando la IL-17 se dobla en su estructura terciaria o cuaternaria para formar un epítipo conformacional el cual se reconoce por un inhibidor de la IL-17, tal como un miembro de unión a la IL-17. En las pruebas para la competencia se puede emplear un fragmento de péptido del antígeno, especialmente un péptido que incluye o que consiste esencialmente de un epítipo de interés. Un péptido que tiene la secuencia del epítipo más uno o más aminoácidos en cualquier extremo se puede usar. Los miembros de unión de acuerdo con la presente invención pueden ser tal que su unión por el antígeno es inhibida por un péptido con o que incluye la secuencia dada.

La presente invención proporciona, además, un ácido nucleico aislado de codificación para un miembro de unión de la presente invención. El ácido nucleico puede incluir ADN y/o ARN. En un aspecto preferido, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica para una CDR o un conjunto de CDR o el dominio VH o el dominio VL o el sitio de unión antígeno-anticuerpo o la molécula de anticuerpo, por ejemplo, scFv o IgG1, por ejemplo IgG1, de la invención como se definió anteriormente.

La presente invención proporciona además las construcciones en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o de expresión que comprenden al menos un polinucleótido como anteriormente.

La presente invención además proporciona una célula huésped recombinante que comprende uno más constructos como los anteriores. Un ácido nucleico que codifica cualquier CDR o conjunto de CDRs o dominios VH o dominios VL o sitio de unión anticuerpo antígeno o molécula de anticuerpo, por ejemplo scFv o IgG1 según se proporciona, forma él mismo un aspecto de la presente invención, como hace un método de producción del producto codificado, cuyo método comprende la expresión a partir del ácido nucleico codificante. La expresión se puede lograr convenientemente mediante el cultivo en condiciones adecuadas de células hospederas recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión, un dominio VH o VL, o miembro de unión se pueden aislar y/o purificar mediante cualquier técnica adecuada, que se usa según corresponda.

El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos que figuran en la presente abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada, y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que U se sustituye por T, a menos que el contexto exija otra cosa.

Otro aspecto adicional proporciona un método de producción de un dominio VH variable del anticuerpo, el método que incluye provocar la expresión del ácido nucleico de codificación. Este método puede comprender el cultivo de las células hospederas en condiciones para la producción de dicho dominio variable VH de anticuerpo.

Los métodos análogos para la producción de los dominios variables VL y miembros de unión tales como los anticuerpos que comprenden un dominio VH y/o VL se proporcionan como otros aspectos de la presente invención.

Un método de producción puede comprender una etapa de aislamiento y/o purificación del producto. Un método de producción puede comprender la formulación del producto en una composición que incluya al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los sistemas de clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células hospederas diferentes se conocen bien. Las células hospederas adecuadas incluyen bacterias, células de mamíferos, células vegetales, hongos filamentosos, levaduras y sistemas de baculovirus y plantas y animales transgénicos. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procariotas está bien establecido en la materia. Para una revisión, ver por ejemplo Plückthun 1991. Un huésped bacteriano común es la *E.coli*.

La expresión en células eucariotas en cultivo está además disponible para los expertos en la materia como una opción para la producción de un miembro de unión por ejemplo Chadd & Chamow (2001), Andersen & Krummen (2002), Larrick & Thomas (2001). Las líneas de células de mamífero disponibles en la materia para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé, células del melanoma del ratón NSO, células de mieloma de rata YB2/0, células embrionarias de riñón humano, células embrionarias de retina humana y muchas otras.

Los vectores adecuados se pueden elegir o construir, que contengan secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según proceda. Los vectores pueden ser plásmidos, por ejemplo, fagómico, o viral, por

ejemplo, 'fago, según sea adecuado . Para más detalle ver, por ejemplo, Sambrook & Russell (2001). Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en las células y expresión génica y análisis de las proteínas, se describen en detalle en Ausubel 1999.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una célula hospedera que contiene el ácido nucleico, como se describe en la presente. Esta célula hospedera puede estar *in vitro* y puede estar en cultivo. Dicha célula huésped puede estar *in vivo*. La presencia *in vivo* de la célula huésped puede permitir la expresión intracelular de los miembros de unión de la presente invención como "intracuerpos" o anticuerpos intracelulares. Los intracuerpos se pueden usar para la terapia génica.

Un aspecto adicional proporciona un método que comprende la introducción del ácido nucleico de la invención en una célula hospedera. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir la transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción mediante el uso de retrovirus u otros virus, por ejemplo, vaccinia o, en células de insecto, baculovirus. Para la introducción del ácido nucleico en la célula hospedera, en particular, una célula eucariota, se puede usar o un sistema que se basa en un virus o en un plásmido. El sistema de plásmido se puede mantener en forma episomal o puede ser incorporado a la célula huésped o en un cromosoma artificial. La incorporación puede ser por integración, aleatoria o específica de una o más copias en un loci único o en múltiples. Para las células bacterianas, las técnicas apropiadas pueden incluir la transformación con cloruro de calcio, la electroporación y la transfección mediante el uso de bacteriófagos.

La introducción se puede seguir por originar o permitir la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, mediante el cultivo de las células huésped en las condiciones para la expresión del gen. La purificación del producto expresado se puede lograr por métodos conocidos para alguien con experiencia en la materia.

En una modalidad, el ácido nucleico de la invención se integra en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula huésped. La integración se puede promover mediante la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar.

La presente invención además proporciona un método que comprende el uso de una construcción como se ha dicho en un sistema de expresión con el fin de expresar un miembro de unión o polipéptido como el anterior.

Los miembros de unión de la presente invención se designan para usarse en métodos de diagnóstico o tratamiento en sujetos humanos o animales, por ejemplo, humano. Por ejemplo, los miembros de unión se pueden usar en el diagnóstico o tratamiento de enfermedades o trastornos asociados a la IL-17, ejemplos de los cuales se refieren en otro lugar en la presente descripción.

Ejemplos adicionales de condiciones para las cuales un miembro de unión de la invención se puede usar en el tratamiento o diagnóstico:

1. Tracto respiratorio: enfermedades obstructivas de las vías respiratorias que incluyen: el asma, incluyendo asma bronquial, alérgica, intrínseca, extrínseca, inducida por el ejercicio, por fármacos (incluyendo la aspirina y la inducida por AINES) y asma inducida por polvo, tanto intermitente y persistente y de todas las severidades, y otras causas de hiper-respuesta de las vías respiratorias; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) , bronquitis, incluyendo bronquitis infecciosa y bronquitis eosinofílica; enfisema, bronquiectasias, fibrosis quística, sarcoidosis; enfermedad del pulmón del agricultor y enfermedades relacionadas; neumonitis por hipersensibilidad, fibrosis pulmonar, incluyendo alveolitis criptogénica fibrosante, neumonías intersticial idiopática, fibrosis que complican la terapia anti-neoplásica y la infección crónica, incluyendo la tuberculosis y la aspergilosis y otras infecciones por hongos; las complicaciones del trasplante de pulmón; trastornos trombóticos y vasculíticos de la vasculatura pulmonar, hipertensión pulmonar y; actividad antitusígena incluyendo el tratamiento de la tos crónica asociada con condiciones inflamatorias y secretoras de las vías respiratorias, tos iatrogénica; rinitis aguda y crónica incluyendo rinitis medicamentosa, y rinitis vasomotora; rinitis alérgica estacional y perenne incluyendo la rinitis nerviosa (fiebre del heno), poliposis nasal, infección viral aguda incluido el resfriado común, y la infección debida al virus sincicial respiratorio, influenza, coronavirus (incluyendo SARS) y adenovirus;

2. Huesos y articulaciones: artritis asociada con o que incluye la osteoartritis/osteoartrosis, tanto primaria como secundaria a, por ejemplo, displasia de cadera congénita; espondilitis cervical y lumbar, y dolor en la espalda baja y el cuello; artritis reumatoide y enfermedad de Still; espondiloartropatías seronegativas que incluyen la espondilitis anquilosante, artritis sorliásica, artritis reactiva y espondartropatía indiferenciada; artritis séptica y otras artropatías relacionadas con infecciones y trastornos de los huesos tales como tuberculosis, que incluyen la enfermedad de

- 5 Potts y el síndrome de Poncet; sinovitis inducida por cristales aguda y crónica que incluye la gota por urato, enfermedad de deposición de pirofosfato de calcio, e inflamación de tendón, bursa y sinovio relacionada con la apatita de calcio; enfermedad de Behcet; síndrome de Sjogren primario y secundario; esclerosis sistémica y escleroderma limitada; lupus eritematoso sistémico, enfermedad mezclada del tejido conectivo, y enfermedad indiferenciada del tejido conectivo; miopatías inflamatorias que incluyen dermatomiositis y polimiositi; polimalgia reumática; artritis juvenil que incluye la artritis inflamatoria idiopática de cualquier distribución en las articulaciones y los síndromes asociados, y fiebre reumática y sus complicaciones sistémicas; vasculitis que incluye arteritis de células gigantes, arteritis de Takayasu, síndrome de Churg-Strauss, poliarteritis nodosa, poliarteritis microscópica, y vasculitis asociada con infección viral, reacciones de hipersensibilidad, crioglobulinas, y paraproteínas; dolor de la espalda baja; fiebre familiar mediterránea, síndrome de Muckle-Wells, y fiebre familiar de Hibernia, enfermedad de Kikuchi; artralgiás inducidas por fármacos, tendonitides, y miopatías;
- 10
- 15 3. Dolor y remodelación del tejido conectivo de los trastornos músculo esqueléticos originados por lesión, por ejemplo lesiones deportivas, o enfermedad: artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, osteoartritis, gota o artropatía por cristal), otro conjunto de enfermedades (como la degeneración del disco intervertebral o degeneración de la articulación temporomandibular), enfermedad de remodelación ósea (como la osteoporosis, enfermedad de Paget o osteonecrosis), policondritits, esclerodermia, trastorno mixto del tejido conectivo, espondiloartropatías o enfermedad periodontal (tal como periodontitis);
- 20
- 25 4. Piel: psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis de contacto u otras dermatosis eczematosa, y reacciones tardías de hipersensibilidad de tipo fito y fotodermatitis; dermatitis seborreica, dermatitis herpetiforme, liquen plano, liquen escleroso y atróptico, pioderma gangrenoso, sarcoidosis de la piel, lupus eritematoso discoide, pénfigo, penfigoide, epidermolisis bulosa, urticaria, angioedema, vasculitis, eritemas tóxicos, eosinofiliás cutáneas, alopecia areata, patrón de calvicie masculino, síndrome de Sweet, síndrome de Weber-Christian, eritema multiforme; celulitis, tanto infecciosas y no infecciosas; paniculitis; los linfomas cutáneos, cáncer cutáneo no melanoma y otras lesiones displásicas; trastornos inducidos por fármacos incluyendo exantema fijo medicamentoso;
- 30
- 35 5. Ojos: blefaritis, conjuntivitis, incluyendo conjuntivitis vernal y alérgica perenne; iritis; uveitis anterior y posterior; coroiditis; autoinmune; trastornos degenerativos o inflamatorios que afectan a la retina; oftalmitis incluyendo oftalmitis simpático; sarcoidosis, incluyendo infecciones virales, micóticas y bacterianas;
- 40
- 45 6. Tracto gastrointestinal: glositis, gingivitis, periodontitis; esofaguitis, que incluye el reflujo; gastro-enteritis eosinofílica, mastocitosis, enfermedad de Crohn, colitis, por ejemplo, colitis ulcerativa, colitis indeterminada, proctitis, colitis microscópica, prurito anal; enfermedad celiaca, síndrome del intestino irritable, trastorno del intestino irritable, diarrea no inflamatoria y alergias relacionadas con el alimento las cuales pueden tener efectos alejados del intestino (por ejemplo, migraña, rinitis o eczema);
- 50
- 55 7. Abdominal: hepatitis, incluyendo autoinmune, alcohólica y viral; fibrosis y cirrosis del hígado; colecistitis, pancreatitis, tanto aguda como crónica;
8. Genitourinario: incluyendo nefritis intersticial y glomerulonefritis, síndrome nefrótico, incluyendo cistitis aguda y crónica (intersticial) cistitis y la úlcera de Hunner; agudas y crónicas, uretritis, prostatitis, epididimitis, salpingitis y ooforitis; vulvovaginitis, enfermedad de Peyronie, disfunción eréctil (tanto en hombres como en mujeres);
9. Rechazo de aloinjertos: agudos y crónicos, por ejemplo, trasplante de riñón, corazón, hígado, pulmón, médula ósea, la piel o la córnea o después de transfusión de sangre; o enfermedad crónica de injerto contra huésped;
10. CNS: la enfermedad de Alzheimer y otros trastornos demenciales incluida la CJD y nvCJD; amiloidosis; esclerosis múltiple y otros síndromes desmielinizantes; aterosclerosis cerebral y vasculitis, arteritis temporal; miastenia grave; dolor agudo y crónico (agudo, intermitente o persistente, ya sea de origen central o periféricos), incluyendo el dolor visceral, dolor de cabeza, migraña, neuralgia del trigémino, dolor facial atípico, articulaciones y dolor de huesos, dolor derivados de cáncer y tumores, los síndromes de dolor neuropático diabético entre ellos, post-herpética, y neuropatías asociadas a VIH; neurosarcoidosis; complicaciones malignas del sistema nervioso central y periférico, procesos infecciosos o autoinmunes;
11. Otros trastornos autoinmunes y alérgicos: incluyendo la tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, la diabetes mellitus, trombocitopenia púrpura idiopática, fascitis eosinofílica, síndrome hiper-IgE, síndrome antifosfolípido;

12. Otros trastornos con una respuesta inflamatoria o componente inmunológico; incluyendo el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la lepra, el síndrome de Sezary, y los síndromes paraneoplásicos;

13. Cardiovascular: arteriosclerosis, que afecta a las arterias coronarias y la circulación periférica, pericarditis, miocarditis, inflamatorias y miocardiopatías autoinmune incluyendo sarcoidosis miocárdica; lesiones por isquemia-reperusión; endocarditis, valvulitis, y entre ellos aortitis infecciosa (por ejemplo sifilitica); vasculitis; trastornos de las venas proximal y periféricas incluidas flebitis y trombosis, entre ellos trombosis venosa profunda y las complicaciones de varices; y

14. Oncología: tratamiento de cánceres entre ellos de próstata, mama, pulmón, ovario, páncreas, intestino y colon, estómago, piel y tumores cerebrales y tumores malignos que afectan a la médula ósea (incluidas leucemias) y sistemas linfoproliferativos, como linfomade Hodgkin y linfoma de no Hodgkin, incluyendo la prevención y el tratamiento de la enfermedad metastásica y recidivas tumorales y los síndromes paraneoplásicos.

Así, miembros de unión de la invención son útiles como agentes terapéuticos en el tratamiento de afecciones que involucran la expresión y/o actividad aberrante de la IL-17. Una modalidad, entre otras, es un método de tratamiento que comprende administrar una cantidad efectiva de un miembro de unión de la invención a un paciente en necesidad del mismo, en donde la expresión y/o actividad aberrante de la IL-17 está disminuida. Otra modalidad, entre otras, es un método de tratamiento que comprende (i) identificar un paciente que demuestra niveles o actividad de IL-17 aberrantes, por ejemplo por medio del uso de medios diagnóstico descritos anteriormente, y (ii) administrar una cantidad efectiva de un miembro de unión de la invención al paciente, en donde la expresión y/o actividad aberrante de la IL-17 está disminuida. Una cantidad efectiva de acuerdo con la invención es una cantidad que disminuye la expresión aberrante de la actividad de la IL-17 con el fin de disminuir o reducir la gravedad de al menos un síntoma de la enfermedad particular o trastorno a tratar pero no necesariamente cura la enfermedad o el trastorno. Correspondientemente, una modalidad de la invención es un método para tratar o reducir la gravedad de al menos un síntoma de cualquiera de los trastornos que se mencionan en la presente, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de uno o más miembros de unión de la presente invención solo o en un régimen terapéutico combinado con otro medicamento adecuado que se conoce en la materia o que se describe en la presente, de forma tal que se reduce la gravedad de al menos un síntoma de cualquiera de los trastornos que se mencionan. Otra modalidad de la invención, entre otras, es un método de antagonizar al menos un efecto de la IL-17 que comprende poner en contacto con o administrar una cantidad efectiva de uno o más miembros de unión de la presente invención de forma tal que al menos dicho efecto de la IL-17 se antagoniza, por ejemplo la unión de la IL-17 al IL-17RA, o efectos corriente abajo tales como la liberación de citocinas.

Correspondientemente, aspectos adicionales de la invención proporcionan métodos de tratamiento que comprenden la administración de un miembro de unión como se proporciona, las composiciones farmacéuticas que comprenden tales miembros de unión, y el uso de tal miembro de unión en la fabricación de un medicamento para la administración, por ejemplo, en un método de fabricación de un medicamento o composición farmacéutica que comprende la formulación del miembro de unión con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Un excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un compuesto o una combinación de compuestos que entran en una composición farmacéutica y no provoca reacciones secundarias y las cuales permiten, por ejemplo, la facilitación de la administración del compuesto(s) activo, un aumento de su vida útil y/o en su eficacia en el cuerpo, un aumento de su solubilidad en solución o bien una mejora en su conservación. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables se conocen bien y serán adaptados por la persona con experiencia en la materia en función de la naturaleza y del modo de administración del principio(s) activo elegido.

Los miembros de unión de la presente invención por lo general se administran en forma de una composición farmacéutica, la cual puede comprender por lo menos un componente, además del miembro de unión. Así, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para el uso de conformidad con la presente invención, pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo, tampón, estabilizadores u otros materiales bien conocidos por aquellos con experiencia en la materia. Estos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del portador u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, inhalado o por inyección, por ejemplo intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral, tales como, por ejemplo, nanocuerpos, etc también se prevén en la presente invención. Tales formulaciones orales pueden ser en forma de tableta, cápsula, polvo, líquido o semisólido. Una tableta puede comprender un vehículo sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un vehículo líquido, tal como agua, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Se pueden incluir solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido o glicoles, tales como glicol de etileno, glicol de propileno o glicol de polietileno.

Para la inyección intravenosa o inyección en el sitio de la afección, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa aceptable por vía parenteral que está libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad, y estabilidad adecuados. Aquellos con experiencia relevante en la materia son capaces de preparar soluciones adecuadas mediante el uso de, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como cloruro de sodio para inyección, inyección de Ringer, inyección de lactato de Ringer. Se pueden emplear conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos como sea necesario, incluyendo tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes, como el ácido ascórbico y la metionina, conservantes (tales como el cloruro de amonio octadecildimetilbencilo, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio, fenol, butil o bencil alcohol; alquil parabenos, tales como el metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular, proteínas, como la albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos, tales como la glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina, monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas, agentes quelantes, tales como EDTA, azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol, contra-iones que forman sales, tales como sodio, complejos de metales (por ejemplo, los complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos, tal como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Los miembros de unión de la presente invención pueden formularse en formas líquida, semisólida o sólida dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la molécula y la vía de suministro. Las formulaciones pueden incluir excipientes, o combinaciones de los excipientes, por ejemplo: azúcares, aminoácidos y surfactantes. Las formulaciones líquidas pueden incluir una amplia gama de concentraciones de anticuerpos y pH. Las formulaciones sólidas se pueden producir por liofilización, atomización, o secado mediante la tecnología de fluidos supercríticos, por ejemplo. Las formulaciones de anti-IL-17 dependerán de la vía de administración prevista: por ejemplo, las formulaciones para la administración pulmonar pueden consistir en partículas con propiedades físicas que garanticen la penetración en lo profundo de los pulmones por inhalación; las formulaciones tópicas pueden incluir agentes modificadores de la viscosidad, que prolongan el tiempo que el fármaco es residente en el lugar de acción. En ciertas modalidades, miembro de unión se puede preparar con un portador que protegerá al miembro de unión contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos, y sistemas de entrega microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno y acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones son conocidos por los expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Robinson, 1978.

El tratamiento anti-IL-17 con un miembro de unión de la invención se puede administrar oralmente (por ejemplo nanocuerpos) por inyección (por ejemplo, subcutáneamente, intra-articular, intravenoso, intraperitoneal, intra-arterial o intramuscularmente), por inhalación, por la vía intravesicular (instilación en la vejiga urinaria), o tópicamente (por ejemplo, intraocular, intranasal, rectal, dentro de heridas, sobre la piel). El tratamiento se puede administrar mediante la infusión de pulso, en particular con disminución de las dosis del miembro de unión. La vía de administración se puede determinar por las características físico-químicas del tratamiento, por consideraciones especiales para la enfermedad o por la necesidad de optimizar la eficacia o reducir al mínimo los efectos secundarios. Una vía particular de administración es la intravenosa. Otra vía de administración de composiciones farmacéuticas de la presente invención es por vía subcutánea. Se prevé que el tratamiento con anti-IL-17 no se limitará a su uso en la clínica. Por lo tanto, la inyección subcutánea mediante un dispositivo sin aguja es también ventajosa.

Una composición se puede administrar sola o en combinación con otros tratamientos, concurrentemente o secuencialmente o como una preparación combinada con otro agente o agentes terapéuticos, en dependencia de la afección a tratar.

Un miembro de unión para la IL-17 se puede usar como parte de una terapia de combinación de conjunto con un componente medicinal adicional. Los tratamientos de combinación se pueden usar para proporcionar importantes efectos sinérgicos, en particular la combinación de un miembro de unión anti-IL-17 con uno o más de otros fármacos. Un miembro de unión para la IL-17 se puede administrar simultáneamente o secuencialmente, o como una preparación combinada con otro agente o agentes terapéuticos para el tratamiento de uno o más de las condiciones que se mencionan en la presente.

Un miembro de unión de acuerdo con la presente invención se puede proporcionar como una terapia única o en combinación o adición con una o más de los siguientes agentes:

- un antagonista de la función de la citocina (por ejemplo, un agente que actúa en las rutas de señalización de la citocina, tal como un modulador del sistema SOCS), tal como un interferón alfa, beta y/o gamma; moduladores del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-1), sus receptores y proteínas de unión asociadas; interleucinas (IL), por ejemplo, una o más de IL-1 a 33, y/o un antagonista o inhibidor de la interleucina, tal como anakinra; inhibidores de los receptores de los miembros de la familia de la interleucina o inhibidores de subunidades específicas de esos receptores, un inhibidor del factor alfa de la necrosis tumoral (TNF- α), tal como un

anticuerpo monoclonal anti-TNF (por ejemplo infliximab, adalimumab y/o CDP-870) y/o un antagonista del receptor TNF, por ejemplo, una molécula de inmunoglobulina (tal como etanercept) y/o un agente de bajo peso molecular, tal como pentoxifilina;

- 5 • un modulador de células B, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal dirigido a los linfocitos B (tal como CD20 (rituximab) o MRA-aIL16R) o linfocitos T (por ejemplo, CTLA4-Ig, HuMax I1-15 o Abatacept);
- un modulador que inhibe la actividad osteoclástica, por ejemplo, un anticuerpo para RANKL;
- un modulador de quimocina o de la función del receptor de quimocina tal como un antagonista de CCR1, CCR2, CCR2A, CCR2B, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 y CCR11 para la familia C-C); CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 y CXCR5 y CXCR6 (para la familia C-X-C) y CX₃CR1 para la familia C-X₃-C;
- 10 • un inhibidor de las metaloproteasas de la matriz (MMP), es decir, una o más de las estromelinas, las colagenasas y las gelatinasas, así como agreganasa, especialmente la colagenasa-1(MMP1), colagenasa-2 (MMP8), colagenasa-3 (MMP13), estromelina-1 (MMP3), estromelina-2 (MMP10) y/o estromelina-3 (MMP11) y/o MMP9 y/o MMP12, por ejemplo, un agente tal como doxiciclina;
- 15 • un inhibidor de la síntesis de leucotrienos, inhibidor de la 5-lipoxigenasa (5-LO) o proteína activadora de la 5-lipoxigenasa (FLAP) antagonistas tales como; zileuton; ABT-761; fenleuton; tepoxalin; Abbott-79175; Abbott-85761; N-(5-sustituido)-tiofeno-2-alquilsulfonamidas; 2,6-di-terc-butilfenolhidrazonas; metoxitetrahidropiranos tales como Zeneca ZD-2138; el compuesto SB-210661; un compuesto piridinilo-sustituido 2-cianoftaleno tal como L-739,010; un compuesto 2-cianoquinolina tal como L-746,530; indol y/o un compuesto quinolina tal como MK-591, MK-886, y/o BAY x 1005;
- 20 • un antagonista del receptor de leucotrienos (LT) B₄, LTC₄, LTD₄, y LTE₄, seleccionado del grupo consistente de la fenotiazina-3-1s como L-651392; compuesto amidino como CGS-25019c; benzoxalaminas como ontazolast; bencenocarboximidamidas como BIII 284/260; y compuestos como zafirlukast, ablukast, montelukast, pranlukast, verlukast (MK-679), RG-12525, Ro-245913, iralukast (CGP 45715A), y BAY x 7195;
- 25 • un inhibidor de la fosfodiesterasa (PDE), tal como una metilxantina, por ejemplo, teofilina y/o aminofilina; y/o un inhibidor selectivo de la isoenzima PDE, por ejemplo, un inhibidor de PDE4 y/o inhibidor de la isoforma PDE4D y/o un inhibidor de PDE5;
- un antagonista del receptor tipo 1 de la histamina, tal como cetirizina, loratadina, desloratadina, fexofenadina, acrivastina, terfenadina, astemizol, azelastina, levocabastina, clorfeniramina, prometazina, ciclizina, y/o mizolastina (generalmente aplicado por vía oral tópica o parenteral);
- 30 • un inhibidor de la bomba de protones (tal como omeprazol) o antagonista del receptor gastroprotector de histamina tipo 2 ;
- un antagonista del receptor de histamina tipo 4;
- un agente simpaticomimético vasoconstrictor agonista de los receptores adrenérgicos alfa-1/alfa-2, como propilhexedrina, fenilefrina, fenilpropanolamina, efedrina, pseudoefedrina, hidrocloreto de nafazolina, hidrocloreto de oximetazolina, hidrocloreto de tetrahidrozolina, hidrocloreto de xilometazolina, hidrocloreto de tramazolina o hidrocloreto de etilnorefina;
- 35 • un agente anticolinérgico, por ejemplo, un antagonista del receptor muscarínico (M1, M2, y M3) , tal como atropina, hioscina, glicopirrolato, bromuro de ipratropio, bromuro de tiotropio, bromuro de oxitropio, pirenzepina y telenzepina;
- 40 • un agonista del adrenoceptor beta (que incluye los subtipos 1-4 del receptor beta), tal como isoprenalina, salbutamol, formoterol, salmeterol, terbutalina, orciprenalina, bitolterol mesilato y/o pirbuterol, por ejemplo, un enantiómero quiral de éste;
- una cromona, por ejemplo, cromoglicato de sodio y/o nedocromil sódico;
- 45 • un glucocorticoide, tal como flunisolida, acetona de triamcinolona, dipropionato de beclometasona, budesonida, propionato fluticasona, ciclesonida, y/o furoato de mometasona;
- un agente que modula los receptores de la hormona nuclear tal como un PPAR;
- una inmunoglobulina (Ig) o preparación de inmunoglobulina o un antagonista o anticuerpo que modula la función de la Ig tal como anti-IgE (por ejemplo omalizumab);
- 50 • otro agente antiinflamatorio aplicado en forma tópica o sistémica, por ejemplo, talidomida o un derivado de éste, un retinoide, ditranol y/o calcipotriol;
- combinaciones de aminosalicilatos y sulfapiridina, tal como sulfasalazina, mesalazina, balsalazida, y olsalazina y agentes inmunomoduladores, tal como las tiopurinas; y corticosteroides, tal como budesonida;
- un agente antibacteriano, por ejemplo, un derivado de penicilina, una tetraciclina, un macrólido, una beta-lactama, una fluoroquinolona, metronidazol, y/o un aminoglucósido inhalado; y/o un agente antiviral, por ejemplo, aciclovir, famciclovir, valaciclovir, ganciclovir, cidofovir; amantadina, rimantadina; ribavirin; zanamavir y/o oseltamavir; un inhibidor de proteasa, tal como indinavir, nelfinavir, ritonavir y/o saquinavir; un inhibidor de la transcriptasa inversa

nucleósido, tal como didanosina, lamivudina, estavudina, zalcitabina o zidovudina; o un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósido, tal como nevirapina, efavirenz;

- un agente cardiovascular tal como un bloqueador del canal de calcio, bloqueador del beta-adrenoceptor, enzima convertidora de angiotensina (ACE), antagonista del receptor de angiotensina-2; agente reductor de lípidos tal como una estatina, y/o fibrato; un modulador de la morfología de las células de la sangre tal como pentoxifilina; un trombolítico, y/o un anticoagulante por ejemplo un inhibidor de la agregación de plaquetas;
- un agente CNS como un antidepresivo (como sertralina), un fármaco anti-Parkinsoniano (como el deprenil, L-dopa, ropinirol, pramipexol, un inhibidor de MAOB como selegina y rasagilina, un inhibidor de comP como tasmar, un inhibidor de A-2, un inhibidor de la recaptación de dopamina, un antagonista del NMDA, un agonista de la nicotina, un agonista de la dopamina o un inhibidor de óxido nítrico sintasa neuronal), y un fármaco contra la enfermedad de Alzheimer, como donepezil, rivastigmina, tacrina, un inhibidor de COX-2, propentofilina o metrifonato
- un agente para el tratamiento del dolor agudo y crónico, por ejemplo, un analgésico de acción central o periférica, tal como un análogo o derivado opioide, carbamazepina fenitoína, valproato sódico, amitriptilina u otro agente antidepresivo, paracetamol, o agente antiinflamatorio no esteroide;
- un agente anestésico local aplicado en forma tópica o parenteral (incluyendo inhalado) tal como lignocaina o un análogo de ésta;
- un agente anti-osteoporosis por ejemplo, un agente hormonal tal como raloxifeno o un bifosfonato, tal como alendronato;
- (i) un inhibidor de triptasa; (ii) un antagonista del factor activador de plaquetas (PAF); (iii) un inhibidor de la enzima convertidora de la interleucina (ICE); (iv) un inhibidor IMPDH; (v) un inhibidor de la molécula de adhesión incluyendo antagonista de VLA-4; (vi) una catepsina; (vii) un inhibidor de quinasa, por ejemplo, un inhibidor de tirosina quinasa (tal como Btk, Itk, Jak3 MAP, los ejemplos de inhibidores pudieran incluir Gefitinib, mesilato de Imatinib), una serina / treonina quinasa (por ejemplo, un inhibidor de MAP quinasa, tal como p38, JNK, proteína quinasas A, B y C y IKK), o una quinasa involucrada en la regulación del ciclo celular (por ejemplo, una quinasa dependiente de cilina); (viii) un inhibidor de glucosa-6 fosfato deshidrogenasa; (ix) un antagonista del receptor B.sub1 y/o B.sub2. de kinina; (x) un agente anti-gota, por ejemplo, colquicina; (xi) un inhibidor de xantinoxidasa, por ejemplo, allopurinol; (xii) un agente uricosúrico, por ejemplo TGFβ, probenecid, sulfipirazona, y/o benzbromarona; (xiii) un secretagogo de la hormona del crecimiento ; (xiv) un factor de crecimiento transformante (); (xv) un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); (xvi) un factor de crecimiento de fibroblastos, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF); (xvii) un factor estimulante de la colonia granulocito macrófago (GM-CSF); (xviii) una crema capsaicina ; (xix) un antagonista del receptor NK.sub1. y/o NK.sub3. de taquikina, tal como NKP-608C, SB-233412 (talnetant) y/o D-4418; (xx) un inhibidor de elastasa, por ejemplo, UT-77 y/o ZD-0892; (xxi) un inhibidor de la enzima de conversión TNF-alfa (TACE); (xxii) un inhibidor de óxido nítrico sintasa inducido (iNOS) o (xxiii) una molécula meloxicam, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, lumarocoxib, parecoxib y aspirina); (xxiv) un inhibidor de un P38; (xxv) un agente modulador de la función de los receptores similares a Toll (TLR) y (xxvi) un agente modulador de la actividad de los receptores purinérgicos, tal como P2X7; (xxvii) un inhibidor de la activación del factor de transcripción, tal como NFκB, API, y/o STATS.

Un inhibidor puede ser específico o puede ser un inhibidor mixto, por ejemplo, un inhibidor que tenga como blanco más de una de las moléculas (por ejemplo, receptores) o clases moleculares que se mencionaron antes.

El miembro de unión también se podría usar en asociación con un agente quimioterapéutico u otro inhibidor de la tirosina quinasa en coadministración o en forma de un inmunoconjugado. Los fragmentos de dicho anticuerpo, también se podrían usar en los anticuerpos biespecíficos obtenidos mediante mecanismos recombinantes o acoplamiento bioquímico y luego la asociación de la especificidad del anticuerpo que se describió anteriormente con la especificidad de otros anticuerpos capaces de reconocer otras moléculas que participan en la actividad para la cual se asocia la IL-17.

Para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, un miembro de unión de la invención se puede combinar con uno o más agentes, tales como: los agentes anti-inflamatorios no esteroideos (en adelante AINE), que incluyen inhibidores de ciclooxigenasa no selectiva (COX)-1/COX-2 aplicada por vía tópica o sistémica (tales como piroxicam, diclofenaco, ácidos propiónicos, tales como el naproxeno, flurbiprofeno, fenoprofeno, ketoprofeno e ibuprofeno, fenamatos, tales como ácido mefenámico, indometacina, sulindaco, azapropazona, pirazonas, tales como fenilbutazona, salicilatos, tales como aspirina); inhibidores selectivos de COX-2 (tales como meloxicam, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, lumarocoxib, parecoxib y etoricoxib); donantes de óxido nítrico inhibidores de la ciclooxigenasa (CINOD); glucocorticosteroides (ya sea administrado por vías tópica, oral, intramuscular, intravenosa o intra-articular); metotrexato, leflunomida, hidroxiclороquina, d-penicilamina, auranofina u otras preparaciones de oro parenteral u oral; analgésicos; diacereína; terapias intra-articulares, tal como derivados de ácido hialurónico y suplementos nutricionales, tales como la glucosamina

Un miembro de unión de la invención se puede usar además en combinación con un agente terapéutico existente para el tratamiento del cáncer. Los agentes adecuados para usarse en combinación incluyen:

- 5 (i) fármacos antiproliferativos/antineoplásicos y las combinaciones de éstos, como se usa en oncología médica, tales como los agentes alquilantes (por ejemplo cis-platino, oxaliplatino, carboplatino, ciclofosfamida, mostaza de nitrógeno, melfalano, clorambucil, busulfán, y nitrosoureas); antimetabolitos (por ejemplo antifolatos tales como fluoropirimidinas como 5-fluorouracil y tegafur, raltitrexed, metotrexato, arabinósido de citosina, hidroxiurea, gemcitabina y paclitaxel); antibióticos antitumorales (por ejemplo antraciclinas como adriamicina, bleomicina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarubicina, mitomicina-C, dactinomicina y mitramicina); agentes antimitóticos (por ejemplo alcaloides vinca como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina y taxoides como taxol y taxotere); e inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, epipodofilotoxinas como etopósido y tenipósido, amsacrina, topotecan y camptotecinas);
- 10 (ii) agentes citostático tales como antiestrógenos (por ejemplo tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno y yodoxifeno), reguladores descendentes del receptor de estrógeno (por ejemplo fulvestran), antiandrógenos (por ejemplo bicalutamida, flutamida, nilutamida y acetato de ciproterona), antagonistas LHRH o agonistas LHRH (por ejemplo goserelina, leuprorelina y buserelina), progestógenos (por ejemplo acetato de megestrol), inhibidores de aromatasa (por ejemplo como anastrozol, letrozol, vorazol y exemestano) e inhibidores de la 5 α -reductasa tales como finasteride;
- 15 (iii) Agentes que inhiben la invasión de las células de cáncer (por ejemplo inhibidores de metaloproteinasas como marimastat e inhibidores de la función del receptor de urocinasa activador del plasminógeno);
- 20 (iv) inhibidores de la función del factor de crecimiento, por ejemplo tales inhibidores incluyen anticuerpos del factor de crecimiento, anticuerpos del receptor del factor de crecimiento (por ejemplo, el anticuerpo trastuzumab anti-erbB2, o el anticuerpo cetuximab anti-erbB1 [C225]), inhibidores de farnesil transferasa, inhibidores de la tirosina quinasa e inhibidores de la serina/treonina quinasa, por ejemplo inhibidores de la familia del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, inhibidores de tirosina quinasa de la familia del EGFR, tales como N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi) quinazolin-4-amina (gefitinib, AZD1839), N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi) quinazolin-4-amina (erlotinib, OSI 774) y 6-acrilamida-N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3-morfolinopropoxi) quinazolin-4-amina (CI 1033)), por ejemplo inhibidores de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas, y por ejemplo inhibidores de la familia del factor de crecimiento de hepatocitos;
- 25 (v) agentes antiangiogénicos tales como aquellos que inhiben los efectos del factor de crecimiento del endotelio vascular, (por ejemplo el anticuerpo anti-factor de crecimiento del endotelio vascular bevacizumab, compuestos tales como aquellos descritos en las solicitudes de patentes internacionales WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 y WO 98/13354, cada una de las cuales se incorpora en la presente descripción en su totalidad) y compuestos que trabajan por otros mecanismos (por ejemplo linomida, inhibidores de la función de la integrina $\alpha\beta3$ y angiostatina);
- 30 (vi) agentes que dañan la vasculatura tales como combretastatina A4 y compuestos descritos en las solicitudes de patentes internacionales WO 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 y WO 02/08213, cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción en su totalidad;
- 35 (vii) terapias antisentido, por ejemplo las que se dirigen a los objetivos enumerados anteriormente, tal como ISIS 2503, un anti-ras antisentido;
- 40 (viii) aproximaciones a la terapia de genes, incluyendo, por ejemplo, aproximaciones para reemplazar genes aberrantes tales como p53 aberrante o BRCA1 o BRCA2 aberrantes, aproximaciones de GDEPT (terapia profármaco enzimas dirigida al gen) tales como aquellas que usan citosina deaminasa, timidina cinasa o una enzima nitroreductasa bacteriana y aproximaciones para aumentar la tolerancia del paciente a la quimioterapia o radioterapia tales como terapia génica de resistencia a múltiples fármacos; y
- 45 (ix) aproximaciones de inmunoterapia, incluyendo por ejemplo aproximaciones *ex vivo* e *in vivo* para aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales del paciente, tal como la transfección con citoquinas como la interleucina 2, interleucina 4 o factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos, aproximaciones para disminuir la anergia de células T, aproximaciones para usar células inmunitarias transfectadas, como células dendríticas transfectadas con citoquinas, aproximaciones para usar líneas celulares tumorales transfectadas con citoquinas y aproximaciones para usar anticuerpos anti-idiotípicos.
- 50

Un miembro de unión de la invención y uno o más de los componentes de medicamentos adicionales se pueden usar en la fabricación de un medicamento. El medicamento puede ser para la administración a un individuo por separado o en combinación, y en consecuencia, puede comprender el miembro de unión y el componente adicional como una preparación combinada o como preparaciones por separado. Las preparaciones por separado se pueden usar para facilitar la administración separada y secuencial o simultánea, y permitir la administración de los componentes por diferentes vías, por ejemplo la administración oral y parenteral.

55

De acuerdo con la presente invención, las composiciones se pueden administrar a mamíferos. La administración puede ser

60

en una "cantidad terapéuticamente efectiva", esto es suficiente para mostrar el beneficio para un paciente. Dichos beneficios pueden ser al menos la mejoría de al menos un síntoma. La cantidad real administrada y la velocidad y la evolución en el tiempo de la administración, dependerán de la naturaleza y la gravedad de lo que se trate, del mamífero en particular a tratar, de la condición clínica de cada paciente, de la causa del trastorno, del sitio de la entrega de la composición, del tipo de miembro de unión, del método de administración, de la programación de la administración y de otros factores conocidos por los médicos. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de los médicos generales y otros médicos, y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o progresión de una enfermedad a tratar. Las dosis apropiadas del anticuerpo se conocen bien en la materia (Ledermann 1991 y Bagshawe 1991). Se pueden usar las dosis específicas indicadas en la presente o en Physician's Desk Reference (2003) según sea adecuado para el tipo de medicamento que se administra. Una cantidad terapéuticamente efectiva o la dosis adecuada de un miembro de unión de la invención se puede determinar mediante la comparación de su actividad *in vitro* e *in vivo* en un modelo animal. Los métodos para extrapolación de las dosis efectivas en ratones y otros animales de prueba a humanos se conocen. La dosis exacta dependerá de una serie de factores, que incluyen si el anticuerpo es para el diagnóstico, prevención o para el tratamiento, el tamaño y la ubicación de la zona a tratar, la naturaleza precisa del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo completo, fragmento, o diacuerpo) y la naturaleza de cualquier etiqueta perceptible u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis típica de anticuerpo estará en el intervalo de 100 µg a 1 g para las aplicaciones sistémicas, y 1 µg a 1 mg para aplicaciones tópicas. Se puede administrar una dosis inicial de carga más elevada, seguida de una o más dosis más bajas. Típicamente, el anticuerpo será un anticuerpo completo, por ejemplo, el isotipo de IgG1. Esta es una dosis para un solo tratamiento de un paciente adulto, que se puede ajustar proporcionalmente para niños y bebés, y también se ajusta para los formatos de otros anticuerpos en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, dos veces por semana, semanal o mensual, según el criterio del médico. Los tratamientos pueden ser cada dos a cuatro semanas para la administración subcutánea y cada cuatro a ocho semanas para la administración intravenosa. En algunas modalidades de la presente invención, el tratamiento es periódico, y el período entre las administraciones es de aproximadamente dos semanas o más, por ejemplo, aproximadamente tres semanas o más, aproximadamente cuatro semanas o más, o aproximadamente una vez al mes. En otras modalidades de la invención, el tratamiento puede administrarse antes, y/o después de la cirugía, y puede administrarse o aplicarse directamente en el sitio anatómico del tratamiento quirúrgico.

30 Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento de anticuerpos guías

35 1.1 Selecciones

Grandes genotecas de Fv de simple cadena (scFv) de anticuerpos humanos clonados en un vector fagómico basadas en el fago filamentososo M13 se usaron para la selección (Vaughan y otros 1996, Hutchings y otros 2001). Los anticuerpos scFv específicos anti-IL-17A se aislaron de genotecas de fagos mediante el uso de una serie de ciclos de selección sobre IL-17A humana recombinante prácticamente como se describió previamente (Vaughan y otros 1996). E resumen la IL-17A humana en PBS (PBS de Dulbecco, pH7.4) se adsorbió sobre los pocillos de una placa de microtítulo toda la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron con PBS y se bloquearon después por 1 h con PBS-Marvel (3% p/v). El fago purificado en PBS-Marvel (3% pv) se añadió a los pocillos y se dejó que se uniera al antígeno recubierto por 1 h. El fago no unido se eliminó por una serie de ciclos de lavado por medio del uso de PBS-Tween (0.1% v/v) y PBS. Las partícula de fago unidas se eluyeron, infectaron en bacteria y rescataron para la próxima ronda de selección (Vaughan y otros 1996).

Un número representativo de los clones individuales de la segunda ronda de selecciones se creó en placas de 96 pocillos. ScFvs se expresaron en el periplasma bacteriano y se tamizaron para su actividad inhibitora en un ensayo de unión al receptor A de IL17 humano. ScFv el cual mostró un efecto inhibitor significativo en la interacción IL-17A:IL-17RA como extractos periplasmáticos crudos, se sometieron a la secuenciación de ADN (Vaughan 1996, Osbourn 1996). Los scFvs únicos se expresaron otra vez en bacteria y se purificaron por cromatografía de afinidad (Bannister y otros 2006), y los valores IC₅₀ se determinaron por pruebas de series de dilución de scFvs purificados en el ensayo de unión receptor-ligando HTRF®, y en los ensayos de liberación de IL-6 HT1080 contra IL-17 humana y de cinomolgo.

55 1.2 Selectividad y reactividad cruzada entre especies de los anticuerpos en ensayos de competencia de epítipo DELFIA®

La reactividad cruzada de las especies y la selectividad de los anticuerpos para los miembros de la familia de IL-17 se estableció usando ensayos de competencia de epítipo DELFIA®, midiendo la inhibición de HIS FLAG IL-17A (HEK EBNA derivado, propio), uniendo cada anticuerpo anti-IL-17 inmovilizado.

60 Las titulaciones de la IL-17A humana purificada no marcada (derivado de E.coli, propio), IL-17B (Peprotech), IL-17C (R & D

Systems), IL-17D (Peprotech), IL-17E (R & D Systems), e IL-17F (Peprotech) se probaron en cada ensayo para establecer la potencia para cada miembro de la familia de IL-17, medido por los valores IC₅₀ en el ensayo.

5 Las titulaciones de las especies de IL-17 que incluyen humana, cinomolgo (derivado de E.coli, propio), e IL-17A de murino(R & D Systems) se probaron en cada ensayo para establecer la reactividad cruzada de las especies de los anticuerpos.

10 Las IgG purificadas se adsorbieron en placas de microtitulación Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) en solución salina regulada con fosfato (PBS), a una concentración que dio una señal significativa cuando se añadió IL-17A humana biotinilada a aproximadamente su Kd estimada para esa IgG en particular. El exceso de IgG se lavó con PBS-Tween (0.1% v/v) y los pocillos se bloquearon con PBS-Marvel (3% p/v) por 1 h. Una serie de dilución del competidor (IL-17A de murino o cinomolgo, o miembros de la familia de IL-17) se preparó en PBS, comenzando a una concentración de aproximadamente 200-veces el valor de Kd de la interacción entre la IL-17A humana biotinilada y la IgG respectiva. La IL-17A humana no biotinilada se usó como un control positivo. Para estas series, se añadió un volumen igual de IL-17A humana recombinante biotinilada a una concentración de aproximadamente 2-veces la Kd (lo que resulta en series que comienzan en una relación de antígeno competidor:IL-17A humana biotinilada de aproximadamente 100:1). Estas mezclas entonces se transfirieron a la IgG bloqueada y se les permitió equilibrar por 1 h. El antígeno no unido se eliminó mediante lavados con PBS-Tween (0.1% v/v), mientras que la IL-17A humana biotinilada se detectó por un conjugado de estreptavidina-Europium3+ (DELFIA® detection, PerkinElmer). La fluorescencia de resolución temporal se midió a 620 nm en un lector de placas EnVision (PerkinElmer). Los datos de fluorescencia se convirtieron a % de unión específica (100% se determinó de los pocillos control que contenían la IL-17A humana biotinilada pero no el competidor, 0 % fue de los pocillos que contenían la IL-17A humana biotinilada y un exceso de 100-veces de IL-17A humana no biotinilada). Los datos resultantes se analizaron usando el software de ajuste de la curva Prism (Graphpad) para determinar los valores IC₅₀. Debido a las diferentes afinidades de cada IgG a la IL-17A, y por lo tanto las diferentes condiciones de ensayo usadas, los resultados se expresaron como veces de diferencia en los valores IC₅₀ entre la IL-17A humana y los antígenos competentes. Esto permite la comparación de diferentes IgG.

Tabla 1: Potencia de los miembros de la familia de IL-17 y diferentes especies IL-17 en ensayos de unión de IgG a la IL-17A humana (DELFIA®)

Nombre del clon	IC ₅₀ (nM)					
	IL-17A humana	IL-17A murina	Veces de diferencia de la IL-17A humana	IL-17A de Cyno	Veces de diferencia de la IL-17A humana	IL-17 B a F Humana
TINA1	12	98	12	NI	-	NI
TINA7	28	NI	-	4	0.14	ND
TINA10	7	50%	-	21	3	NI
TINA11	4	NI	-	28	7	NI
Anticuerpo 1	6	NI	-	69	11.5	NI
TINA21	6	NI	-	20	3.1	NI
TINA22	7	NI	-	7	1	ND
TINA48	9	NI	-	7	0.8	NI
TINA51	25	35	0.7	NI	-	NI

ND indica no determinado, NI no inhibición. No se observó inhibición de la unión de IL-17A humana con la IL-17B a F para cualquiera de los clones probados.

30 1.3 Inhibición de la unión de IL-17A al receptor de IL-17

35 Los resultados de la selección se tamizaron en un formato de ensayo de unión receptor-ligando HTRF® (Fluorescencia homogénea de resolución temporal, CIS Bio internacional) para la inhibición de la unión ya sea de la IL-17A humana biotinilada (Peprotech 200-17), o la IL-17A humana etiquetada con HIS FLAG (derivada de HEK EBNA propia) a la proteína de fusión IL-17RA Fc (R & D Systems 177-IR). Un Acn anti-IL-17 de referencia (Biosource) se incluyó en todos los ensayos de potencia como un control positivo. El método detallado del ensayo se proporciona en la sección Materiales y Métodos de ensayo.

Los ejemplos de las potencias de los scFv guías obtenidas de los ensayos de unión de la IL-17A humana etiquetada con HIS FLAG a la proteína de fusión IL-17RA Fc se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Ejemplos de las potencias de los scFv guías en los ensayos de unión de la HIS FLAG IL-17A a IL-17RA Fc

Nombre del clon	IC ₅₀ (nM) en el ensayo de HTRF®	Nombre del clon	IC ₅₀ (nM) en el ensayo de HTRF®
TINA1	213	TINA22	53
TINA7	118	TINA48	57
TINA10	59	TINA51	80
TINA11	156	TINA55	79
Anticuerpo 1	12	TINA62	4
TINA21	36	TINA107	25

5

1.4 Unión al epítipo

10

Los scFv guía se probaron en ensayos de competencia del epítipo para la inhibición de IL-17A humana HIS FLAG (derivado de HEK EBNA propio) que se une a los anticuerpos IL-17 anti-humanos que incluyen el Anticuerpo 1 parental, Acm317 (R & D Systems) o el Acm Biosource.

15

Los ensayos de competencia del epítipo usando el Acm317 o el Acm Biosource involucró pre-incubar 3 nM o 6 nM de anticuerpo anti-IL-17 con 20 nM o 10 nM de Fc anti-murino marcado con XL665 (CIS Bio International 61PAMXLB) en 50mM tampón HEPES que contenía 0.4M de fluoruro de potasio y 0.1% BSA (tampón de ensayo) respectivamente. La detección del anticuerpo y XL665 se pre-incubaron por 1 h en la oscuridad a temperatura ambiente. Para el ensayo usando el Anticuerpo 1, el Anticuerpo 1 se marcó directamente con criptato (CIS Bio International 62EUSPEA) y se diluyó 500-veces en tampón de ensayo antes del uso.

20

En paralelo, para los ensayos usando Acm317 o Acm Biosource, 10 nM de IL-17A biotinilado (20 nM monomérico) se pre-incubaron por 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad con 3.2 nM de criptato de estreptavidina en el tampón de ensayo. Para el ensayo del Anticuerpo 1, 2 nM de IL-17A HIS FLAG (4 nM monomérico) se pre-incubaron por 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad con 2 nM de anticuerpo anti-Flag marcado con XL665 (CIS Bio International 61FG2XLB) en el tampón de ensayo.

25

Después de la pre-incubación de los reactivos, 10 µl de la muestra de scFv purificada se añadió a una placa de ensayo de poco volumen de 384 pocillos (Costar). Esto fue seguido por la adición de 5 µl del anticuerpo IL-17 pre-incubado y su detección XL665 por ensayos usando Acm317 o el Acm Biosource, y después 5 µl de la IL-17A humana biotinilada y mezcla de detección de criptato.

30

Para el ensayo del Anticuerpo 1, 10 µl de muestra de scFv purificado se añadieron a una placa de ensayo de poco volumen de 384 pocillos, seguido por la adición de 5 µl del Anticuerpo 1 etiquetado con criptato, y después 5 µl de la HIS FLAG IL-17A y la mezcla de detección XL665.

35

Las placas de ensayo después se centrifugaron a 1000 rpm a temperatura ambiente por 1 min, y se incubaron hasta 4 h a temperatura ambiente, antes de leer la fluorescencia resuelta en el tiempo a las longitudes de onda de emisión 620 nm y 665 nm por medio del uso de un lector de placas EnVision (Perkin Elmer).

40

Los datos se analizaron por el cálculo de los valores de % Delta F (CIS Bio International) para cada muestra, los que se usaron después para determinar el % de unión específica.

Los resultados se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: Ejemplos de resultados de la caracterización de los scFv guías en un ensayo de competencia de epítipos de la IL-17A

Nombre del clon	Inhibición en el ensayo de competencia de epítipos contra:		
	Anticuerpo 1	Acm 317	Acm Biosource
TINA1	+++	+	+++

Nombre del clon	Inhibición en el ensayo de competencia de epítomos contra:		
	Anticuerpo 1	Acm 317	Acm Biosource
TINA7	+	+	+
TINA10	+++	+	+++
TINA11	+++	+	+++
TINA12	+++	+	+++
TINA21	+++	++	+++
TINA22	+++	+++	++
TINA48	+++	+	+++
TINA51	++	+	++
TINA55	+/-	+	+++
TINA62	+/-	+	++
TINA107	+++	+	+++
Anticuerpo 1 (TINA12 IgG1)	+++	-	+++
Acm 317 (sistemas de I & D)	+/-	+++	+/-
Acm Biosource	+++	+/-	+++

+++ se observó una buena inhibición.
 + se observó una pobre inhibición.
 - no se observó inhibición

5 Se observaron diferentes grados de inhibición entre el panel guía de scFv en los 3 ensayos de competencia de epítomos, lo que indica que algunos de estos clones reconocen epítomos ligeramente diferentes o superpuestos de otros scFv en el panel, y de los Acsm con los cuales se configuraron estos ensayos.

1.5 Cambio de formato de scFv a IgG1

10 Los clones se convirtieron de scFv a formato IgG por sub-clonaje de los dominios V_H y V_L en vectores que expresan las cadenas de anticuerpo pesadas y ligeras completas respectivamente. El dominio V_H se clonó en un vector (pEU15.1) que contenía los dominios constantes de cadena pesada humana y elementos reguladores para expresar la cadena pesada de IgG completa en células de mamífero. Del mismo modo, el dominio V_L se clonó en un vector (pEU4.4) para la expresión de los dominios constantes de la cadena ligera humana (lambda) y elementos reguladores para expresar toda la cadena ligera de IgG en células de mamífero. Los vectores para la expresión de las cadenas pesadas y cadenas ligeras se describieron originalmente en Persic y otros, 1997. Los vectores de Cambridge Antibody Technology se modificaron simplemente por la introducción de un elemento OriP. Para obtener IgG, los vectores que expresan las cadena pesada y ligera de IgG se transfectaron en células de mamíferos EBNA-HEK293. Las IgG se expresaron y se secretaron al medio. Las cosechas se concentraron y filtraron antes de la purificación. La IgG se purificó usando cromatografía de la proteína A. Los sobrenadantes de cultivo se cargan en una columna de Proteína A Cerámica de tamaño apropiado (BioSeptra) y se lavaron con 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl. La IgG unida se eluyó de la columna mediante el uso de 0,1 M de citrato de sodio (pH 3.0) y se neutralizó por la adición de Tris-HCl (pH 9.0). Al material que eluyó se le cambió la solución tampón a PBS en columnas Nap10 (Amersham, # 17-0854-02) y la concentración de IgG se determinó espectrofotométricamente por el uso de un coeficiente de extinción que se basó en la secuencia de aminoácidos de la IgG, Mach y otros, 1992. La agregación o degradación de la IgG purificada se analizaron por SEC-HPLC y por SDS-PAGE.

1.6 Liberación de IL-6 de células HT1080 inducida por IL-17

30 Para determinar la bioactividad de los inhibidores de IL-17, la actividad de scFv y IgG se evaluó en un ensayo de célula de fibrosarcoma humano HT1080. Estas células responden a la IL-17 humana liberando IL-6 en una manera dependiente de la dosis. Para detalles sobre el método del ensayo, ver la sección de "Materiales y métodos de ensayo".

En este ensayo, la actividad inhibidora, determinada por sus valores IC_{50} de un panel de scFv anti-IL-17/IgG se determinó en respuesta a 1 nM de IL-17A humana o 1 nM de IL-17A de primate no humana cinomolgo (cyno). Las potencias de scFv e IgG obtenidas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Ejemplos de potencias de scFv e IgG en el ensayo HT1080

Nombre del clon	IL-17 humana		IL-17 de Cyno
	Inhibición de scFv	IgG IC_{50} (nM)	IgG IC_{50} (nM)
TINA1	la	50% inhibición	la
TINA10	inhibición	54 ±26 (n=3)	155 ±26 (n=3)
TINA11	inhibición	92 ±16 (n=2)	216 ±188 (n=2)
Anticuerpo 1	inhibición	22 ±10 (n=6)	172 ±32 (n=5)
TINA21	inhibición	29 ±11 (n=6)	28 ±15 (n=5)
TINA48	inhibición	69 ±15 (n=3)	33 ±4 (n=3)
TINA51	inhibición	17 (n=1)	la
NT No probado			
IA Inactivo			

Los scFv del aislamiento guía generalmente dieron inhibiciones débiles en el ensayo de HT1080, de forma tal que las potencias no se pudieron determinar. Por lo tanto, a cualquier scFv que exhibió inhibición en el ensayo de HT1080 se le cambió el formato a IgG1 y se re-evaluó en el ensayo para determinar la potencia con más precisión, y permitir la clasificación de los clones.

Ejemplo 2: Optimización del anticuerpo

2.1 Maduración de la afinidad

Los anticuerpos guías se optimizaron por medio del enfoque de mutagénesis dirigida y la selección de exhibición en fago basada en la afinidad. Grandes genotecas de scFv-fagos derivados de los clones guías se crearon por mutagénesis dirigida de oligonucleótidos de la regiones variables determinantes de la complementariedad 3 (CDR3) de las cadenas pesada (V_H) y ligeras (V_L) por el uso de técnicas estándar de biología molecular como se describió (Clackson 2004). Las genotecas se sometieron a selecciones que se basaron en la afinidad por la exposición en fagos con el fin de seleccionar variantes con una mayor afinidad por la IL-17A humana. En consecuencia, esto mostraría una actividad inhibitoria mejorada para la unión de la IL-17A a su receptor. Las selecciones se llevaron a cabo esencialmente como se describió previamente (Thompson 1996). En breve, las partículas scFv-fago se incubaron con la IL-17A humana recombinante biotinilada en solución (bio-huIL-17A, derivada de HEK EBNA propia y modificada propia). Los ScFv-fagos unidos a los antígenos se capturaron luego en perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina (Dynabeads[®] M-280) según las recomendaciones del fabricante. Las partículas de fagos seleccionados scFv se rescataron después según lo descrito previamente (Osborn 1996), y el proceso de selección se repitió en presencia de concentraciones decrecientes de bio-huIL-17A (100 nM a 10 pM en 5 rondas). Los extractos periplasmáticos que contienen scFv se prepararon de un número representativo de clones individuales a partir de los resultados de la selección y se tamizaron por la habilidad de inhibir la unión de bio-huIL-17A humana al receptor A de IL-17 humana esencialmente como se describió en el Ejemplo 1. Las rondas de selección, es decir, las variantes de scFv, que mostraron un efecto inhibitorio significativamente mejor en comparación con sus respectivos anticuerpos parentales, se sometieron a secuenciación de ADN, se produjeron variantes únicas como scFv purificados para una caracterización adicional (ver Ejemplo 1).

Algunos scFv se seleccionaron después y se convirtieron a IgG1 como se describe en el Ejemplo 1 y se probaron nuevamente. En un esfuerzo por obtener ganancias de potencia adicionales, V_H y V_L mejorados se recombinaron en la etapa transfección y las IgG1 resultantes se evaluaron. La recombinación de V_H y V_L en el nivel de transfección se reconoce como una técnica algo impredecible, con éxito mezclado en los anticuerpos generadores de potencia mejorada. Sin embargo, casualmente, en este caso la técnica tuvo éxito para producir un número de IgG de alta potencia, que incluye los anticuerpos 3, 4, 5, 7, 9, 10 y 12, como se describe más abajo.

2.2 Línea germinal

Las secuencias de aminoácidos de los dominios V_H y V_L de los anticuerpos anti-IL-17A optimizados se alinearon con secuencias de línea germinal humana conocidas en la base de datos VBASE (Tomlinson 1997), y la línea germinal más cercana se identificó por similitud de secuencia. Para los dominios V_H del linaje de anticuerpo Tina 12 esta fue VH3-23. Para los dominios V_L fue VΛ6a.

Sin considerar los residuos de Vernier (Foote & Winter 1992), los cuales se dejaron sin cambiar, hubo un cambio en los marcos de los dominios V_H y 2 cambios en los dominios V_L , todos los cuales se revirtieron a las secuencias de línea germinal más cercanas para corresponder idénticamente con anticuerpos humanos por medio del uso de técnicas de mutagénesis dirigida estándar con los cebadores adecuados. Los residuos de Vernier en el dominio V_H fueron la Arg C-terminal en VH FR3 (residuo número 98 en la secuencia del dominio V_H), la cual no se cambió a la Lys de línea germinal. Los residuos de Vernier en el dominio V_L fueron la Ile en VL FR2 (residuo número 47 en la secuencia del dominio V_L), la cual no se revirtió a la Thr de línea germinal, y Phe en VL FR2 (residuo número 50 en la secuencia del dominio V_L), la cual no se revirtió a la Tyr de línea germinal.

2.3 Ensayo receptor-ligando HTRF® de los clones optimizados

Los resultados de la selección optimizados se tamizaron en un ensayo de unión receptor-ligando HTRF® para la inhibición de la unión de IL-17A humana etiquetada con HIS FLAG (derivada de HEK EBNA propia) a la proteína de fusión IL-17RA Fc, como se describió en la sección Materiales y Métodos del ensayo.

Las potencias de los scFv purificados identificados como aciertos a partir del tamizaje se determinaron después en el ensayo de unión receptor-ligando HTRF®. Los ejemplos de las potencias de los scFv guías que se obtuvieron se muestran en la Tabla 5. Los datos mostrados aquí son para las secuencias de anticuerpo que no son de la línea germinal.

Tabla 5: Ejemplos de las potencias optimizadas de los scFv guías en el ensayo receptor -ligando HTRF

Nombre del clon	IC ₅₀ (nM) en el ensayo de HTRF®	Nombre del clon	IC ₅₀ (nM) en el ensayo de HTRF®
Anticuerpo 1	12.0	Anticuerpo 13	1.6
Anticuerpo 2	0.7	Anticuerpo 14	2.5
Anticuerpo 3	ND	Anticuerpo 15	1.6
Anticuerpo 4	ND	Anticuerpo 16	1.6
Anticuerpo 5	ND	FORD022E03	8
Anticuerpo 6	1.7	FORD023A05	6
Anticuerpo 7	ND	FORD025D03	7
Anticuerpo 8	0.7	FORD022B08	6
Anticuerpo 9	ND	FORD023B10	4
Anticuerpo 10	ND	FORD146B02	13
Anticuerpo 11	0.6	FORD016D04	0.6
Anticuerpo 12	ND	Acm Biosource	1.5

*ND = no determinado, ya que scFv de estos clones no está disponible. Estos clones se crearon por recombinación en la etapa IgG.

2.4 Ensayo de liberación de IL-6 de HT1080 de los clones optimizados

El mejoramiento de la bioactividad a continuación de la optimización de los anticuerpos del aislamiento guía se ensayó en las células de fibrosarcoma humano HT1080 como se describió en la sección "Materiales y Métodos del ensayo". Todos los ensayos se llevaron a cabo por medio del uso de IL-17A humana derivada del sistema de expresión HEK-EBNA, e IL-17A de cinomolgo ya sea derivada de *E. coli* o de los sistemas de expresión HEK EBNA.

Se evaluó un panel de scFv/IgG anti-IL-17 optimizados en el ensayo de HT1080 en respuesta a 1 nM de IL-17A humana o 1 nM de cinomolgo (cino) de forma dependiente de la concentración. Ejemplos de las potencias de scFv e IgG obtenidas se muestran en la Tabla 6A.

Tabla 6A: Ejemplos de potencias mejoradas de scFv e IgG en el ensayo HT1080 .

Nombre del clon	IL-17 humana		IL-17 de Cyno		Veces de diferencia en la reactividad cruzada (IgG)
	scFv IC ₅₀ (nM)	IgG IC ₅₀ (nM)	scFv IC ₅₀ (nM)	IgG IC ₅₀ (nM)	
Anticuerpo 1	70% inhibición	23.0	la	144.0	6
Anticuerpo 2	16.2	1.5	99.0	18.3	12
Anticuerpo 3	-	0.8	-	13.0	16
Anticuerpo 4	-	0.9	-	7.3	8
Anticuerpo 5	-	1.4	-	39.7	28
Anticuerpo 6	31.2	1.5	135.8	39.6	26
Anticuerpo 7	-	0.7*	-	5.0 [†]	7
Anticuerpo 8	34.3	2.9	96.4	53.0	18
Anticuerpo 9	-	2.3	-	9.2	4
Anticuerpo 10	-	2.2	-	4.9	2
Anticuerpo 11	8.2	2.2	20% inhibición	25.0	4
Anticuerpo 12	-	2.1	-	4.2	2
Anticuerpo 13	35.9	2.0	147.0	28.8	14
Anticuerpo 14	36.7	1.8	99.5	29.0	16
Anticuerpo 15	21.7	1.7	158.8	30.9	19
Anticuerpo 16	13.0	1.6	249.0	29.5	19
FORD023B10	24.7	3.4	14.1	1.5	2
FORD023A05	30.6	3.3	17.0	8.7	3
FORD025D03	34.1	2.5	26.3	6.6	3
FORD022B08	39.6	4.5	22.1	4.6	1
FORD022E03	47.7	14.6	31.2	17.0	1
FORD146B02	52.1	9.3	30.7	17.5	2
Acm 317 (sistemas de I & D)	-	3.2	-	14.1	4
Acm Biosource	-	6.2	-	6.8	1

* Experimentos adicionales (conjunto de datos n=15) indicó un valor de media geométrica IC₅₀ de 0.8, 95% intervalos de confianza 0.6 a 1.0
[†] Experimentos adicionales (conjunto de datos n=12) indicó un valor de media geométrica IC₅₀ de 4.8, 95% intervalos de confianza 3.2 a 6.4.

2.5 Ensayo de células HT1080 que mide la liberación sinérgica de IL-6

- 5 Las células HT1080 pueden responder a la IL-17A humana y al TNF α humano al liberar sinérgicamente IL-6 de forma dependiente de la concentración. La bioactividad de los Anticuerpos 2 y 7 a la respuesta sinérgica de IL-6 se ensayó por medio del uso de una modificación del método del ensayo de células HT1080 descrito previamente, en el cual la liberación de IL-6 se midió en respuesta a 125pM de IL-17 humana y 25pM de TNF α humano (ver sección "Materiales y Métodos del ensayo").

Ambos Anticuerpos 2 y 7 neutralizaron la respuesta sinérgica de IL-6. Ejemplos de los valores de IC₅₀ se muestran en la Tabla 6b.

5

Tabla 6b: Ejemplos de potencias de IgG1 en el ensayo de IL-17/TNFα HT1080

Nombre del clon	IgG IC ₅₀ (nM)
Anticuerpo 7	0.24 (95% CI 0.19-0.28)
Anticuerpo 2	0.41

2.6 Inhibición de la respuesta inducida por la IL-17A nativa en las células HT1080

10

La habilidad de los anticuerpos de inhibir una fuente nativa de IL-17A se ensayó por medio del uso IL-17A derivada de células T humanas primarias. La IL-17A recombinante derivada de E. Coli es no-glicosilada a diferencia de una fuente natural la cual tiene un sitio de glicosilación N-enlazado. Ensayar los anticuerpos por medio del uso de la IL-17A derivada de células T asegurará que la actividad se mantiene contra una fuente natural de proteína.

15

Las células T de donantes humanos sanos se estimularon por medio del uso de condiciones para aumentar la producción de IL-17A. Estos sobrenadantes contendrán otras citocinas tales como TNFα la cual mantiene una sinergia con cualquier IL-17A presente. El medio condicionado de las células T se añadió a células HT1080 en presencia o ausencia de anticuerpo y se ensayó la inducción de IL-6 sobre los valores iniciales. A partir de esto, se calcularon los valores de IC₅₀. Un método detallado para este ensayo se proporciona en la sección Materiales y Métodos del ensayo.

20

Tabla 6c: Efectos de los anticuerpos en la inducción de la producción de IL-6 por sobrenadantes de células T en células HT1080 (los valores de IC₅₀ se calcularon en nM, con 95% intervalos de confianza)

	IC ₅₀ (nM)	
Anticuerpo (IgG1)	Promedio (95% CI)	n
Anticuerpo 2	0.25 (0.09 - 0.74)	3
Anticuerpo 7	0.13 (0.04 - 0.46)	3

2.7 Selectividad y reactividad cruzada entre especies de los anticuerpos optimizados en ensayos de competencia de epítipo HTRF®

25

La selectividad y reactividad cruzada de las especies de los anticuerpos guía para los miembros de la familia de IL-17 se estableció usando ensayos de competencia de epítipo HTRF®, midiendo la inhibición de HIS FLAG IL-17A (HEK EBNA derivado, propio) uniendo cada anticuerpo anti-IL-17 optimizado.

30

Las titulaciones de la IL-17A humana purificada no marcada (derivado de E.coli, propio), IL-17B (Peprotech), IL-17C (R & D Systems), IL-17D (Peprotech), IL-17E (R & D Systems), e IL-17F (Peprotech) se probaron en cada ensayo para establecer la potencia para cada miembro de la familia de IL-17, medido por los valores IC₅₀ en el ensayo.

35

Las titulaciones de las especies de IL-17 que incluyen IL-17A humana, cinomolgo, perro (todas propias derivadas de E. Coli) y murino (R & D Systems) se probaron en cada ensayo para establecer la reactividad cruzada de las especies de los anticuerpos optimizados.

40

Los resultados se resumen en la Tabla 7. Los datos iniciales indicaron que los anticuerpos guía optimizados probados fueron selectivos para la IL-17A humana, y no reconocieron los miembros de la familia IL-17B, C, D, E y F.

En experimentos adicionales, se observó la inhibición parcial con IL-17F humana, cuando se usó a una concentración de 1 μM o mayor, con el Anticuerpo 7.

45

Además todos los anticuerpos optimizados probados reconocieron la IL-17A humana, cinomolgo y perro con diferentes grados de potencia. La IL-7A murina no se reconoció por ninguno de los anticuerpos optimizados.

Tabla 7: Potencia de los miembros de la familia de IL-17 y diferentes especies de IL-17 en el ensayo optimizado unión de IgG a IL-17A humana (HTRF®)

Ensayo optimizado del anticuerpo	IC ₅₀ nM de especies/miembros de la familia de IL-17								
	IL-17A humana	IL-17A de Cyno	IL-17A murina	IL-17A de Perro	B	C	d	e	F
FORD023A05	1.5	ND	ND	ND	NI	NI	NI	NI	NI
Anticuerpo 2	2.9 (1.6*)	4.5	NI	34	NI	NI	NI	NI	NI
Anticuerpo 7	1.4 (0.9*)	2.0 (1.7*)	NI	14 (11.9*)	NI	NI	NI	NI	Inhibición parcial observada (20% inhibición a aprox 1µM o más)
Acm Biosource	3.7	4.0	NI	50nM	NI	NI	NI	NI	NI

B = IL-17B humana
 C = IL-17C humana
 D = IL-17D humana
 E = IL-17E humana
 F = IL-17F humana
 NI = ninguna inhibición
 ND = no determinado* Los valores en corchete representan los valores de IC₅₀ promedio calculados subsecuentemente obtenidos de 2 o más experimentos separados.

Ejemplo 3: Afinidad de los anticuerpos para la IL-17A humana

3.1 Análisis de pA₂

Para caracterizar adicionalmente los anticuerpos anti-IL-17A se realizó un análisis pA₂ en los anticuerpos, usando el método descrito en la sección Materiales y Métodos de ensayo. Este se usó para estimar la constante de equilibrio de disociación (Kd) para la IgG contra la IL-17A humana. El análisis se realizó usando células de fibrosarcoma HT1080 humanas y HEK EBNA expresadas por IL-17A humana.

El análisis estimó que las afinidades anti-IL-17 IgG estaban entre 65 pM y 550 pM para la IL-17A humana, y los datos de ejemplos se muestran en la Tabla 8. El análisis se realizó además con el Acm Biosource y un Acm control negativo. La afinidad de los anticuerpos aislados se muestra que es entre 2 y 5 veces mayor que el Acm Biosource.

Tabla 8a: Ejemplo de afinidades de IgG por la IL-17A humana

	Valor pA ₂	Kd (pM)
Anticuerpo 2	9.73	188
Anticuerpo 7	9.23	553
Acm Biosource	8.96	1100

3.2 Datos de afinidad de unión por medio del uso de análisis de biosensor

El BIAcore 2000 (GE Healthcare) se usó para evaluar los parámetros cinéticos de la interacción entre el Anticuerpo 7 y diferentes especies de IL-17A.

El Biosensor usa los efectos ópticos de la resonancia de plasmones superficiales (SPR) para estudiar cambios en la concentración de superficie que resultan de la interacción de una molécula analito que fluye sobre una molécula ligando unida covalentemente a una capa de dextrana de un chip biosensor. Típicamente, una concentración definida de las especies analito fluyen sobre el ligando acoplado y cualquier unión se detecta como un aumento en la señal SPR local (fase de asociación). Esto se continúa con un período de flujo de tampón, durante el cual la disociación de las especies analito se puede observar como una disminución en la señal (fase de disociación). El analito remanente se puede desprender del ligando unido al chip y repetirse el procedimiento a varias concentraciones diferentes del analito. Una serie de controles se emplean normalmente durante un experimento para asegurar que ni la capacidad de unión absoluta o el perfil cinético del ligando acoplado cambian de manera significativa durante todo el experimento. Una solución salina tamponada con hepes registrada (HBS-EP) se usa típicamente como el tampón diluyente principal para las muestras de analito y como el tampón de flujo durante la fase de disociación. Los datos experimentales se registran como Unidades de Resonancia arbitrarias

(RUs, las cuales son unidades arbitrarias que corresponden directamente a la señal SPR) contra tiempo (segundos). Las RUs son directamente proporcionales a los cambios en el índice de refracción en la superficie del chip lo cual su vez es una medida aproximada de la masa del analito unido. El paquete de software BIAevaluation puede usarse entonces para procesar los datos y ajustar los modelos de unión a los conjuntos de datos. Las constantes de velocidad de asociación ($M^{-1} s^{-1}$) y disociación (s^{-1}) que resultan permiten el cálculo de las constantes de Afinidad de Asociación (M^{-1}) y Disociación (M).

La afinidad del anticuerpo 7 se estimó por medio del uso de un único ensayo en el cual la IgG₁ se acopló covalentemente (enlace amina) a la superficie de un chip CM3 registrado para una densidad superficial final de 300 RU. Una serie de diluciones de la IL-17A recombinante humana o de cinomolgo (0.78 - 50 nM) se pasaron después secuencialmente sobre el anticuerpo 7. La molaridad del ligando se basó en la absorbancia a 280 nm y los coeficientes de extinción se calcularon por medio del uso de métodos publicados. El dato del flujo de la célula blanco se sustrajo de la IgG₁, y un tampón HBS-EP blanco se sustrajo del conjunto de datos principal ("doble sustracción de blanco"). El modelo de Langmuir 1:1 y modelos de analito bivalente se ajustaron a los datos de cada conjunto de concentraciones de analito simultáneamente por medio del uso del software BIAevaluation 3.2.

La validez de los datos se ensayó/restringió por el valor calculado de Chi² y T (parámetro valor/balance), que tuvo que ser <2 y > 100 respectivamente.

El anticuerpo 7 se inmovilizó a la superficie del chip CM3 y una serie de diluciones de las variantes de la IL-17 recombinante (0.78 - 50 nM) se pasaron secuencialmente sobre la IgG₁. Los datos se ajustaron simultáneamente al modelo 1:1 Langmuir (k_a k_d simultáneas) y simultáneamente al modelo de analito bivalente (k_a k_d simultáneas). El modelo de analito bivalente dio mejores ajustes según se juzgó a ojo y por sus valores superiores de Chi². Una constante de afinidad (K_D) se calculó entonces a partir de la relación de las constantes de velocidad k_d/k_a .

Tabla 8b: Análisis cinético del anticuerpo 7

Antígeno	1:1 Langmuir K _D (nM)	Analito bivalente K _D (nM)
IL-17A Humana (<i>E. coli</i>)	0.195	2.098
IL-17A Cyno (<i>E. coli</i>)	0.512	1.340
IL-17A-Flag-His10 humana (HEK)	0.171	0.41-1.88

Ejemplo 4: Inhibición de la actividad inducida por IL-17A en condrocitos primarios humanos

La destrucción del cartílago articular es una característica de muchas enfermedades inflamatorias que incluyen artritis reumatoide y osteoartritis. El tipo de célula principal dentro del cartílago articular de las articulaciones es el condrocito. Los condrocitos primarios humanos pueden aislarse del tejido eliminado durante la cirugía de reemplazo de la rodilla. Las células se extraen del cartílago por digestión con colagenasa y se cultivan bajo condiciones asépticas para usa en ensayos *in vitro*. Los condrocitos cuando se estimulan con IL-17 recombinante o nativa producen un intervalo de mediadores inflamatorios y destructivos que incluyen citocinas (tales como IL-6, IL-8), PGE₂ y enzimas degradativas tales como MMP13. El ensayo se describe en detalle en la sección de Materiales y Métodos de ensayo en la presente descripción.

Las Tablas 9a y 10a muestran datos preliminares para los anticuerpos IgG1 usados en este ensayo. Las Tablas 9b y 10b muestran datos actualizados calculados para un conjunto de datos mayor (n números aumentados).

Tabla 9a: Los datos preliminares de la Inhibición de la liberación de IL-6 inducida por IL-17A a partir de condrocitos primarios humanos por anticuerpos anti-IL-17A

IgG1	0.2nM IL-17A	n	2nM IL-17A	n
FORD023A05	2.77(1.05 - 7.31)	4	5.75(2.69 - 12.30)	4
Anticuerpo 2 (no GL*)	0.85(0.44 - 1.65)	4	5.76(3.39 - 9.90)	4
Acm Biosource	1.02(0.78 - 1.32)	9	5.18(4.02 - 6.67)	12
TINA10	27.23(10.02 - 74.00)	5	87.97(52.92 - 146.24)	7
Anticuerpo 1	29.85(11.23 - 79.29)	4	75.67(27.55 - 207.82)	4

Media geométrica IC₅₀ se muestra en nM (95% límites de confianza).
 *El Anticuerpo 2 se usó en forma de línea no germinal en este ensayo.

Tabla 9b: Datos actualizados de la Inhibición de la liberación de IL-6 inducida por IL-17A a partir de condrocitos primarios humanos por anticuerpos anti-IL-17A

IgG1	0.2 nM IL-17A	n	2 nM IL-17A	n
Anticuerpo 2	1.52 (0.61 - 3.78)	5	5.51 (3.54 - 8.57)	5
Acm Biosource	1.03 (0.80 - 1.33)	12	5.70 (4.64 - 7.01)	12
Anticuerpo 7	0.51 (0.18 - 1.43)	6	1.44 (0.79 - 2.64)	6
Media geométrica IC ₅₀ se muestra en nM (95% límites de confidencia).				

5

Tabla 10a : Datos preliminares de la Inhibición de la liberación de IL-8 inducida por IL-17A a partir de condrocitos primarios humanos por anticuerpos anti-IL-17A

IgG1	0.2nM IL-17A	n	2nM IL-17A	n
FORD023A05	2.77 (1.86 - 4.11)	7	7.84 (4.12 - 14.90)	7
Anticuerpo 2 (no GL*)	0.74 (0.46 - 1.18)	7	3.81 (2.24 - 6.45)	7
Anticuerpo 2	2.30	3	7.91	3
Anticuerpo 7	0.17	3	1.60	3
Acm Biosource	0.78 (0.52 - 1.17)	10	3.98 (3.09 - 5.12)	14
TINA10	21.42 (12.85 - 35.69)	7	61.96 (45.76 - 83.90)	9
Anticuerpo 1	18.12 (10.7 - 30.67)	4	44.47 (39.93 - 49.53)	4
Media geométrica IC ₅₀ se muestra en nM (95% límites de confidencia).				
*Anticuerpo 2 se probó en las formas de línea germinal y no germinal en este ensayo.				

Tabla 10b : Datos actualizados de la Inhibición de la liberación de IL-8 inducida por IL-17A a partir de condrocitos primarios humanos por anticuerpos anti-IL-17A

IgG1	0.2nM IL-17A	n	2nM IL-17A	n
Anticuerpo 2	1.49 (0.80 - 2.78)	8	7.18 (4.38 - 11.75)	8
Anticuerpo 7	0.30 (0.14 - 0.63)	8	1.30 (1.10 - 1.54)	9
Acm Biosource	0.85 (0.58 - 1.24)	14	5.09 (4.06 - 6.37)	15
Media geométrica IC ₅₀ se muestra en nM (95% límites de confidencia).				

10

Tabla 11: Inhibición de la liberación de MMP13 inducida por IL-17A a partir de condrocitos primarios humanos por anticuerpos anti-IL-17A

IgG1	0.2nM IL-17A	n	2nM IL-17A	n
FORD023A05	4.79	2	6.84, >50	2
Anticuerpo 2 (no GL*)	1.55	2	11.53	2
Acm Biosource	1.69 (1.01-2.82)	7	11.56 (8.05 - 16.60)	7
TINA10	59.06 (22.49 - 155.07)	6	Intervalo: 63.4 - >400	7
Anticuerpo 1	110.04 (35.29 - 343.16)	4	Intervalo: 147 - >400	5
Media geométrica IC ₅₀ se muestra en nM (95% límites de confidencia).				
*El Anticuerpo 2 se usó en forma de línea no germinal en este ensayo.				

15

Tabla 12: Inhibición de la liberación de PGE₂ inducida por IL-17A a partir de condrocitos primarios humanos por anticuerpos anti-IL-17A

IgG1	2nM IL-17A	n
------	------------	---

IgG1	2nM IL-17A	n
FORD023A05	4.75	3
Anticuerpo 2 (no GL*)	1.94	3
Acm Biosource	2.83	3
TINA10	NT	
Anticuerpo 1	NT	
Media geométrica IC ₅₀ se muestra en nM (95% límites de confidencia). NT: No probado *El Anticuerpo 2 se usó en forma de línea no germinal en este ensayo.		

Ejemplo 5: Inhibición de la actividad biológica *in vivo* inducida por IL-17A en la bolsa de aire de ratones Balb C

5.1 Formación de la bolsa de aire

Ratones Balb C se anestesiaron con isoflurano y se afeitaron por la superficie dorsal. Para formar la bolsa de aire, 2.5 ml de aire estéril filtrado se inyectó sub-cutáneamente en la línea media dorsal con una aguja de 25g. Los ratones se llevaron a sus jaulas post recuperación y el día 3 los ratones fueron delicadamente reprimidos y la bolsa se re-infló con 2.5 ml de aire estéril.

Los anticuerpos (IgG1) se evaluaron usando dos métodos: pre-mezcla, donde le anticuerpo e IL-17 se mezclan antes de la inyección, y sistémico, donde le anticuerpo se administra antes de la inyección de IL-17A. En el caso de la dosificación sistémica, el anticuerpo se diluyó en PBS estéril y se inyectó como un bolo, por vía intra-peritoneal el día 5.

En el día 6 los ratones nuevamente se restringieron delicadamente y cada animal recibió un volumen de inyección intrabolsa de 1 ml 0.5% metilcelulosa que contiene IL-17A humana derivada de *E. Coli*(reactivo propio) ya sea sola (en el caso del control, o los animales dosificados sistémicamente) o en combinación con anticuerpos anti-IL-17 (anticuerpo e IL-17A pre-mezclado). En estos experimentos, el anticuerpo y el ligando se mezclaron y pre-incubaron a 37°C p or 30 min antes de la inyección en la bolsa. Los ratones retornaron a sus cajas originales hasta el muestreo terminal punto en el cual se sacrificaron con concentraciones crecientes de CO₂. Para auxiliar la recuperación del fluido de lavado de la bolsa, 2 ml de PBS que contenían 4 mM EDTA se inyectaron gentilmente dentro de la bolsa y la bolsa se palpó delicadamente por aproximadamente 15 seg. El fluido de lavado se retiró delicadamente de la bolsa y se decantó en un tubo de polipropileno graduado. El volumen recuperado se registró. Las muestras se mantuvieron en hielo hasta que se procesaron para el almacenamiento.

5.2 Análisis del fluido de lavado

Conteo total de leucocitos (TWBC)

A cada vasija Coulter que contenía 10 ml de Isoton, se añadieron 20 µl de fluido de lavado. Las muestras se leyeron en duplicado en un contador Coulter Z1, se produjo un conteo duplicado para cada muestra y se mantuvo la lectura de fondo a < 2000. Los números de células se ajustaron después para tomar cuenta del volumen de lavado recuperado de la bolsa.

Cuantificación de IL-6

Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min y 300 µl del sobrenadante se alicuotaron en placas de 96 pocillos en triplicado y se conservaron a -20°C hasta que estuvieran listas para el análisis. 50 µl de los estándar, controles y muestras del fluido de lavado se analizaron por el kit de ELISA para la citocina IL-6 murina Quantikine de R & D Systems (Catalogue # M6000B) según el protocolo del kit

Las concentraciones de IL-6 en el fluido de lavado se determinaron a partir de la curva de IL-6 estándar de ratón por medio del uso del lector de placas de ELISA SoftMax Pro a 450 nm y corrección de longitud de onda de 540 nm.

5.3 Inhibición de la liberación de IL-6 inducida por IL-17A en la bolsa de aire

Tabla 13a: Inhibición de la liberación de IL-6 inducida por IL-17A en bolsa de aire en ratón: anticuerpo e IL-17A pre-mezclados

	IL-6	
Anticuerpo (IgG1)	Máximo % de inhibición	ID ₅₀ µg
Anticuerpo 2 (no GL*)	46 ± 9	4 ± 3
FORD023A05	51 ± 15	10 ± 11
Acm Biosource	96 ± 8	6 ± 2
Anticuerpo 7	115.9	0.5

*El Anticuerpo 2 se usó en forma de línea no germinal en este ensayo.

Tabla 13b: Inhibición de la liberación de IL-6 inducida por IL-17A en bolsa de aire en ratón: administración sistémica del anticuerpo

	IL-6	
Anticuerpo (IgG1)	Máximo % de inhibición	ID ₅₀ µg (95% CI)
Anticuerpo 7	85.2	0.056 (-0.071 - 0.184)

5.4 Inhibición de la afluencia de células blancas de la sangre inducida por la IL-17A en la bolsa de aire

[0313]

Tabla 14a: Inhibición de la afluencia de leucocitos inducida por la IL-17A en la bolsa de aire: anticuerpo e IL-17A pre-mezclados

	Conteos de TWBC	
Anticuerpo (IgG1)	Máximo % de inhibición	ID ₅₀ µg
Anticuerpo 2 (no GL*)	110 ± 23	1 ± 0.4
FORD023A05	91 ± 5	17 ± 12
Acm Biosource	71 ± 7	3 ± 1.4
Anticuerpo 7	111	0.3

*El Anticuerpo 2 se usó en forma de línea no germinal en este ensayo.

Tabla 14b: Inhibición de la afluencia de leucocitos inducida por la IL-17A en la bolsa de aire: administración sistémica del anticuerpo

	TWBC	
Anticuerpo (IgG1)	Máximo % de inhibición	ID ₅₀ µg (95% CI)
Anticuerpo 7	100.9	0.617 (-0.518 - 1.752)

Ejemplo 6: ensayos de sinergia IL-17A/TNFα

6.1 Sinergia IL-17A/TNFα en explantos de cartílago post mortem

La destrucción del cartílago articular es una característica de muchas enfermedades inflamatorias que incluyen artritis reumatoide y osteoartritis. El tipo de célula principal dentro del cartílago articular de las articulaciones es el condrocito. El cartílago humano puede aislarse del tejido eliminado durante la cirugía de reemplazo de la rodilla o a partir de donantes post-mortem. Los discos del explante se cortan a partir del cartílago y se cultivan bajo condiciones asépticas para usar en ensayos *in vitro*, reteniendo los condrocitos dentro de su matriz celular. Los explantos cuando se estimulan con IL-17A o TNFα producen un intervalo de mediadores inflamatorios y destructivos que incluyen citocinas tales como IL-6. Un método detallado para este ensayo se proporciona en la sección Materiales y Métodos de ensayo.

En experimentos iniciales para ensayar los efectos funcionales de los anticuerpos en ensayos de sinergia de IL-17/TNF α en explantes de cartílago, los datos de IC₅₀ no se generaron debido al suministro limitado de tejido. El % de inhibición contra la respuesta en ausencia de miembro de unión (0% inhibición) se calculó para una concentración dada del miembro de unión. Los datos se muestran en la Tabla 15a. En experimentos adicionales los datos de IC₅₀ se calcularon como se muestra en la Tabla 15b.

IL-17A y TNF α en conjunto indujeron una respuesta de IL-6 sinérgica, la cual se inhibió por anticuerpos neutralizantes de la IL-17A. Los anticuerpos controles de isotipo no afectaron la respuesta sinérgica.

Tabla 15a: Efecto de los anticuerpos en la respuesta de IL-6 sinérgica a IL-17A y TNF α en explantes de cartílago humano post-mortem (error = desviación estándar de 12 réplicas, n = 1 donante)

Anticuerpo (IgG1)	IL-6 (pg/ml)		% Inhibición
	Promedio	SEM (+/-)	
IL-17A 10 ng/ml	0.38	0.16	-
TNF 1 ng/ml	6.19	3.32	-
IL-17A + TNF	55.00	4.62	0
IL-17A + TNF + Acm Biosource	4.91	1.08	91.1
IL-17A + TNF + mIgG1 isotipo control	47.41	5.77	13.8
IL-17A + TNF + Anticuerpo 2 (no GL*)	4.63	2.30	91.6
IL-17A + TNF + hIgG1 isotipo control	53.17	8.59	3.3

*El Anticuerpo 2 se usó en forma de línea no germinal en este ensayo.

Tabla 15b: IC₅₀s de los anticuerpos en respuestas de IL-6 sinérgicas a IL-17A y TNF α en explantes de cartílago humano post-mortem (datos medios, 95% intervalos de confianza)

Anticuerpo (IgG1)	IC ₅₀ promedio (95% CI)	n
Anticuerpo 2	3.39	2
Anticuerpo 7	0.61 (0.26 - 1.42)	5

6.2 Sinergia de IL-17A/TNF α en fibroblastos sinoviales de OA

Una característica del daño articular en enfermedades tales como artritis reumatoide incluye la presencia de un sinovio inflamado compuesto por células del sistema inmune que incluyen por ejemplo macrófagos, células T, células B y fibroblastos en proliferación. El sinovio inflamado se puede aislar del tejido de articulaciones separado durante la cirugía de remplazo de la articulación. El sinovio se digiere con colagenasa y las células aisladas se cultivan bajo condiciones acépticas para usar en ensayos *in vitro*, con una composición celular predominantemente de fibroblastos. Los fibroblastos cuando se estimulan con IL-17A o TNF α producen una variedad de mediadores inflamatorios y destructivos que incluyen citocinas tales como IL-8. Un método detallado para este ensayo se proporciona en la sección Materiales y Métodos del ensayo.

La IL-17A y el TNF α juntos inducen una respuesta sinérgica de IL-8 por medio del uso de dos conjuntos diferentes de concentraciones de citocinas. Esta respuesta se redujo por medio del uso de anticuerpos neutralizantes de la IL-17A aunque los anticuerpos controles de isotipo no tuvieron ningún efecto en la respuesta sinérgica.

Tabla 16a: Efecto de los anticuerpos en la respuesta de IL-8 sinérgica de IL-17A (10 ng/ml) y TNF α (1 ng/ml) en fibroblastos sinoviales OA humanos (concentración de citocina en pg/ml, error = desviación estándar de puntos de datos triplicados, n = 1 donante)

Anticuerpo (IgG1)	IL-8 (pg/ml)	
	Promedio	% Inhibición
IL-17A 10 ng/ml + TNF 1 ng/ml	62519.10	0

	IL-8 (pg/ml)	
Anticuerpo (IgG1)	Promedio	% Inhibición
IL-17A + TNF + hIgG1 isotipo control	64967.81	-3.9
IL-17A + TNF + FORD23A05	32117.64	48.6
IL-17A + TNF + Anticuerpo 2	23340.13	62.7
IL-17A + TNF + Anticuerpo 7	20829.47	66.7

Tabla 16b: Efecto de los anticuerpos en la respuesta de IL-8 sinérgica de IL-17A (1 ng/ml) y TNF α (0.01 ng/ml) en fibroblastos sinoviales OA humanos (concentración de citocina en pg/ml, error = desviación estándar de puntos de datos triplicados, n = 1 donante)

	IL-8 (pg/ml)	
Anticuerpo (IgG1)	Promedio	% Inhibición
IL-17A 1 ng/ml + TNF 0.01 ng/ml	3255.86	0
IL-17A + TNF + hIgG1 isotipo control	3298.59	-1.3
IL-17A + TNF + FORD023A05	1731.59	46.8
IL-17A + TNF + Anticuerpo 2	1506.59	53.7
IL-17A + TNF + Anticuerpo 7	1107.75	66.0

5 6.3 Inhibición de la IL-8 inducida por IL-17A e IL-17A/TNF α en fibroblastos sinoviales RA

Como se señaló en 6.2, el sinovio inflamado es una característica fundamental de RA. El sinovio de RA se puede aislar del tejido de articulación separado durante la cirugía de remplazo de articulación por medio del uso de los mismos métodos descritos. Estas células son relevantes para la enfermedad y responden a IL-17A y TNF α con la producción de citocinas que incluyen la IL-8. Una respuesta sinérgica se produce cuando ambas citocinas se añaden simultáneamente. Un método detallado para este ensayo se proporciona en la sección Materiales y Métodos del ensayo.

15 Tabla 17: Efecto de los anticuerpos (IC₅₀s) en las respuestas de IL-8 inducidas por IL-17A e IL-17A/TNF α en fibroblastos sinoviales RA humanos (datos medios, 95% intervalos de confianza)

Anticuerpo (IgG1) y estimulación	IC50 nM promedio, 95% CI	n
Anticuerpo 7 versus IL-17A (2 nM)	2.85 (1.96 - 4.15)	3
Anticuerpo 7 versus IL-17A (1 nM) y TNF α (0.1 ng/ml)	4.97 (1.48 - 16.73)	3

Ejemplo 7: Mapeo del epítipo de la unión del anticuerpo 7 a la IL-17A humana

20 7.1 Perturbación de la velocidad de intercambio deH/D de IL-17A por el anticuerpo 7

En el primer experimento la IL-17A se intercambió por D₂O en solución, unida al anticuerpo 7 (IgG1) inmovilizado en una columna, y después se intercambió de vuelta en H₂O mientras todavía estaba unida al anticuerpo en la columna, lo que resulta en que el epítipo se protege durante la reacción de intercambio de vuelta y consecuentemente se etiqueta con deuterones. En el segundo experimento la IL-17A primero se unió al anticuerpo 7 (IgG1) en la columna, después se etiquetó con D₂O y finalmente se intercambió de vuelta en H₂O mientras todavía estaba unida a la columna, de forma que ninguna de las partes de la IL-17A se etiquetó con deuterones. Las diferencias en masas de péptidos entre los dos experimentos se determinaron después. La diferencia en los niveles de deuteración entre los dos experimentos es una medida del retardo del intercambio cuando está unida al anticuerpo. Un método detallado para este protocolo se proporciona en la sección Materiales y métodos de ensayo.

30 La IL-17A etiquetada N-terminalmente se usó en este estudio con la secuencia que se muestra en la Fig 1 (sec. con núm. de ident.: 197). Los residuos 1-21 representan un péptido etiqueta el cual se añadió para propósitos de detección y comprende "AvtagTM", que permite la biotinilación enzimática específicamente en el residuo de lisina en la etiqueta. Gly22 es el primer residuo de la IL-17A madura.

La única región que muestra una perturbación significativa en la velocidad de intercambio H/D fue entre los aminoácidos 92-108 de la sec. con núm. de ident.: 197 que se muestra en la Figura 1 que abarca la secuencia CRHLGCINADGNVDYHM (sec. con núm. de ident.: 199). Esta secuencia corresponde a los residuos 71-87 de la IL-17A humana madura (sec. con núm. de ident.: 198).

Tabla 18: Diferencia de porcentaje en los niveles de deuteración al comparar la deuteración y el intercambio de vuelta a protones cuando está unida al anticuerpo 7 con deuteración en solución e intercambio de vuelta a protones cuando está unida al anticuerpo. Las diferencias de más del 10% especialmente en momentos tempranos se consideraron significativas. La numeración del residuo es con la secuencia que se muestra en la Figura 1 (sec. con núm. de ident.: 197)

Número del residuo		Punto de tiempo (s)			
inicio	Fin	150	500	1500	5000
3	8	-5	0	-4	1
11	17	-4	-3	-1	-1
20	44	-3	-3	-1	-3
47	63	-1	-2	-2	-2
66	74	-8	-13	-12	-13
77	89	-1	-1	1	-2
92	108	-23	-21	-15	-13
111	118	-3	-2	-2	-2
121	131	-5	-3	-1	-2
134	137	-3	-2	0	0
140	153	-5	-9	-8	-3

7.2 Análisis de la unión de la IL-17A mutante al anticuerpo 7

Una segunda aproximación se tomó para confirmar que el epítipo identificado en el ejemplo 7.1 es correcto. Esto tomó ventajas de la observación de que el anticuerpo 7 no se une a la IL-17A murina aunque la IL-17A murina señalará a través del receptor de IL-17A humana para inducir la síntesis de IL-6. La secuencia del péptido identificado en el ejemplo 7.1 (CRHLGCINADGNVDYHM, sec. con núm. de ident.: 199) tiene siete cambios entre las secuencias humana y murina. Si estas regiones en efecto contienen el epítipo que une el anticuerpo 7 después cuando los siete residuos se cambien de los residuos humanos a los equivalentes murinos después se esperaría que la IL-17A mutante resultante todavía funcione con el receptor humano pero no se una o se inhiba por el anticuerpo 7.

La IL-17A mutante tiene los siguientes cambios (L74Q, G75R, I77V, D80E, N82K, V83L, Y85H) y se muestra en la Figura 2 (sec. con núm. de ident.: 200). Después de eliminar secuencia señal el primer residuo es Gly24. Cinco residuos de histidina se añadieron en el C-terminal para ayudar a la purificación. La forma madura de la IL-17A mutante humana es la sec. con núm. de ident.: 201.

En consecuencia, IL-17A mutante se clonó y expresó en la línea celular HEK/EBNA de mamífero. El medio de cultivo se recogió y la proteína se purificó usando cromatografía de Ni. Una descripción detallada de este proceso se da en la sección de Materiales y Métodos. La IL-17A silvestre se clonó y después se expresó y purificó por el mismo protocolo.

La unión de las moléculas de IL-17A silvestre y mutante se analizó por medio del uso de BIAcore con el anticuerpo 7 (IgG1) inmovilizado a un chip CM5 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Esto resultó en la inmovilización de 5275 Unidades de respuesta (RU).

Tabla 19: La unión de la IL-17A silvestre y mutante al anticuerpo 7 inmovilizado en la superficie del chip sensor CM5.

Ligando	RU (+ SEM) promedio
IL-17A mutante	8.0 (5.4)
IL-17A silvestre	539.1 (0.2)

No hubo unión a la IgG control (Cambridge Anticuerpo Technology). La IL-17A silvestre se unió muy fuerte al anticuerpo 7 inmovilizado. En contraste la IL-17A mutante no mostró unión al anticuerpo 7. La baja señal RU observada se puede adjudicar al "ruido" de fondo solamente. La ausencia de unión detectable a la IL-17A mutante proporciona evidencias adicionales de que la secuencia que se muestra en el Ejemplo 7.1 (sec. con núm. de ident.: 199) contiene al menos parte del epítipo reconocido por el Anticuerpo 7, es decir que el anticuerpo une uno o más residuos en la sec. con núm. de ident.: 199.

7.3 Efectos del anticuerpo sobre la liberación de la IL-6 de células HT1080 inducida por las formas mutantes de la IL-17A

Para determinar la bioactividad de la IL-17A mutante (mutantes como se describe en el Ejemplo 7.2), las respuestas se evaluaron en un ensayo en la célula de fibrosarcoma humano HT1080. Para detalles sobre el método del ensayo, ver la sección de "Materiales y métodos de ensayo".

En este ensayo, la EC_{50} s (la concentración que da la mitad de la respuesta máxima) de la IL-17A (E. Coli, Peprotech o HEK EBNA, derivada propia) o la IL-17A mutante (propia, derivada de HEK EBNA) sobre la liberación de IL-6 se ensayó (Tabla 20a). Secundariamente, la actividad inhibitoria, según se determinó por sus valores de IC_{50} , de la IgG anti-IL-17 (hasta 50 nM) se determinó en respuesta a la IL-17A o la IL-17A mutante (se usaron concentraciones sub-máximas). La potencia del anticuerpo 7 (como IgG1) como un ejemplo contra varias formas de IL-17A se muestran en la Tabla 20b. La IgG control no demostró inhibición de la respuesta de IL-6 en este ensayo.

Tabla 20a: Ejemplos de EC_{50} s de la liberación de IL-6 inducida por IL-17A o IL-17A mutante en el ensayo de HT1080

Ligando	Fuente	EC_{50} (nM)
IL-17A	Peprotech (E. Coli)	0.40
IL-17A	Propio (HEK EBNA)	0.52
IL-17A mutante	Propio (HEK EBNA)	2.36

Tabla 20b: Ejemplos de IC_{50} s del anticuerpo 7 contra la IL-17A o la IL-17A mutante en el ensayo de HT1080

Ligando	Fuente	[Ligando] (nM)	Anticuerpo 7 IC_{50} (nM)
IL-17A	Peprotech (E. Coli)	1	0.35
IL-17A	Propio (HEK EBNA)	2	0.43
IL-17A mutante	Propio (HEK EBNA)	1	Ninguna inhibición

7.4 Determinación de la estructura de cristal de rayos X para el complejo IL-17A anticuerpo

Una estructura de la IL-17A unida al Fab del anticuerpo 7 se determinó por cristalografía de rayos-X. Los métodos para la preparación de Fab, preparación de la proteína IL-17A, cristalización y cristalografía se establecen en la sección de Materiales y Métodos.

Se obtuvieron cristales del complejo IL-17A / Fab que fueron placas finas del grupo de espacio monoclinico $P2_1$. Se obtuvieron los datos de la difracción completa a una resolución de 2.6 Å. La estructura se pudo resolver por Reemplazo Molecular por medio del uso del fragmento Fab como un modelo de ensayo, y así se orientó y posicionó el fragmento Fab en la unidad asimétrica cristalográfica. Hubo cuatro fragmentos Fab en la unidad asimétrica. Hubo densidad electrónica adicional en la cual se podría modelar el dímero de IL-17A. Se encontraron dos dímeros de IL-17A en la unidad asimétrica.

En la estructura en cristal, cada dímero de IL-17A se une a dos fragmentos Fab. El dímero de IL-17A es una molécula alargada la cual se caracteriza por hebras-beta larga. La estructura es similar a la reportada para la IL-17F (Hymowitz y otros, 2001). El dímero de IL-17A se intercala entre dos fragmentos Fab. Los dos sitios de interacción son equivalentes; ellos se relacionan por la simetría del dímero de IL-17A. Una porción del dímero de IL-17A distal de los fragmentos Fab de unión está desordenada, lo cual significa que es flexible y adopta diferentes orientaciones a lo largo del cristal de forma que la densidad electrónica se promedia. Así, no es posible construir un modelo de esta parte del dímero de IL-17A. El complejo, por lo tanto, hace interacciones de red cristalina mediadas a través de moléculas Fab solamente. Para usar los descriptores usados por Hymowitz y otros. (2001), los sitios de interacción de epítipos están cerca del "collarín" de la estructura, mientras la región "falda" en el extremo opuesto está desordenada.

La estructura de cristal permite examinar las interacciones epitópicas entre la IL-17A y el Fab en detalle atómico. Los datos se muestran en la Tabla 22.

5

Tabla 22: interacciones directas IL-17A/Fab

IL-17A	Fab		Distancia [Å]
Enlaces de hidrógeno			
		Fab Kabat no.	
Ser A40 O	Ser H30 OG	H30*	2.9
Asp A42 N	Ser H31 OG	H31	3.2
Asp A42 OD1	Thr H28 OG	H28	2.9
Asp A42 OD1	Tyr H32 OH	H32	2.7
Arg A46 NH2	Leu H100 O	H96	2.6
Arg A46 NH1	Ser H31 O	H31	2.8
Tyr B85 O	Tyr L94 OH	L91	2.5
His B86 NE2	Ala L30 O	L29	3.0
Asn B88 OD1	His H102 N	H98	2.8
No polar (la distancia corresponde a al par de átomos más próximos)			
Ser A40	Thr H28	H28*	3.5
Ser A41	Thr H28	H28*	3.7
Tyr A43	Ser H31	H31	3.6
Ser A41	Ser H31	H31	3.4
Arg A46	Tyr H32	H32	3.4
His B86	Asn L31	L30	3.5
His B86	Tyr L32	L31	3.8
Tyr B85	Tyr L32	L31	3.7
His B86	Tyr L33	L32	3.4
Pro B126	Tyr L33	L32	3.3
Pro B126	Phe L50	L49*	3.4
Ile B127	Gln L54	L53	3.2
Tyr B85	Pro L96	L93	3.7
Leu B74	Pro L96	L93	3.6
Leu B74	Tyr H59	H58	3.6
Pro B126	Leu H100	H96	3.6
Asn B88	Ile H101	H97	3.4
Met B87	Ile H101	H97	3.8
His B86	Ile H101	H97	3.8
Leu B74	His H102	H98	3.9

En la Tabla 22, el número del residuo contiene un indicador de cadena (H: Fab de cadena pesada, L: Fab de cadena ligera, A: monómero A en la IL-17A, B: monómero B en la IL-17A). La numeración de residuo de la IL-17A corresponde a la secuencia madura sec. con núm. de ident.: 198. La numeración de residuo de los dominios Fab VH y VL corresponde a sec.

10

con núm. de ident.: 62 y sec. con núm. de ident.: 176 respectivamente. La numeración de residuos de Kabat para los Fab se muestra además. Los *asteriscos indican los residuos del marco de Fab. La distancia de corte usada para los enlaces de hidrógeno es 3.2Å, para las interacciones no- polares 4.0Å.

5 Las distancias se obtuvieron por medio del uso del programa CCP4 CONTACT (CCP4, 1994). Es necesario describir solamente uno de los dos sitios de interacción, ya que son equivalentes. Las interacciones involucran las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de ambas la cadena pesada y la cadena ligera del fragmento de anticuerpo, y residuos de aminoácidos de ambos monómeros en el dímero de IL-17A. La cadena pesada del anticuerpo interactúa con ambas cadenas A y B en el dímero de IL-17A, mientras que la cadena ligera interactúa solamente con el monómero B. Los residuos de aminoácidos en la IL-17A que forman parte del sitio de interacción son Ser40 a Tyr43 inclusive y Arg46 en la cadena A, y Leu74, Pro91, Tyr85 a Asn88 y Pro126 a Ile127 en la cadena B del dímero. Los residuos aportados por la cadena ligera del Fab son Ala30 a Tyr33, inclusive, Phe50, Gln54, Tyr94 y Pro96. Los residuos de la cadena pesada son Thr28, Ser30 a Tyr32, Tyr59, y L100 a H102. Así, en la IL-17A, doce aminoácidos forman el sitio epitópico, e interactúan con dieciséis residuos de aminoácidos en el anticuerpo. Las interacciones incluyen 9 enlaces de hidrógeno e interacciones no-polares de van der Waals (además denominadas interacciones hidrofóbicas). Algunas de las interacciones hidrofóbicas incluyen interacciones de apilamiento electrónico, que involucran electrones pi en un sistema aromático.

20 El examen de la estructura del cristal indicó que algunos de los residuos del Fab que parecen interactuar con la IL-17 pudieran sustituirse por otros residuos que pudieran mantener una interacción.

25 Por ejemplo, el enlace de hidrógeno entre Ala30L (residuo de Kabat 29 en LCDR1) y la IL-17 es al oxígeno de la cadena principal de la alanina y no involucra la cadena lateral de la Ala, la cual está localizada en la superficie del miembro de unión. Esto indica que otros residuos de aminoácidos se pudieran sustituir por Ala en esta posición sin perder la interacción, y así no resultaría en una pérdida de la afinidad del miembro de unión por la IL-17A.

30 Los enlaces de hidrógeno además se forman entre átomos de la cadena principal del miembro de unión en Ser31H, Leu100H, Ala30L e His102H, lo que indica que otros residuos se podrían sustituir en estas posiciones sin perder estos enlaces de hidrógeno.

35 La cadena principal C-alfa de Asn31L (residuo de Kabat 30 en LCDR1) forma una interacción no- polar con la IL-17, la cual además no se afectaría por la sustitución de este residuo.

Los siguientes son ejemplos adicionales, no exhaustivos, de residuos que se indica que interactúan con la IL-17, en base a los exámenes de la estructura, y consideraciones de la localización y naturaleza de las interacciones, e impedimentos estéricos:

- Ser, Ala, Gly, Thr o Cys en el residuo de Kabat 31 de HCDR1
- Tyr en el residuo de Kabat 32 de HCDR1
- Tyr o Phe en el residuo de Kabat 58 de HCDR2
- 40 • un residuo hidrófobo, por ejemplo, Leu, Ile, Val, Ala o Phe, en el residuo de Kabat 96
- un residuo hidrófobo, por ejemplo, Ile, Leu, Val, Ala or Phe, en el residuo de Kabat 97 de HCDR3
- un residuo cíclico, por ejemplo, His, Trp o Phe en el residuo de Kabat 98 de HCDR3
- Tyr o Phe en el residuo de Kabat 31 de LCDR1
- Tyr o Phe en el residuo de Kabat 32 de LCDR1
- 45 • un residuo polar, por ejemplo, Gln, en el residuo de Kabat 53 de LCDR2
- Tyr en el residuo de Kabat 91 de LCDR3
- Pro, hidroxiprolina, His, 3-metilhistidina o Asp en el residuo de Kabat 93 de LCDR3
- Thr o Ser en el residuo de Kabat 28 en el FR1 de cadena pesada
- Ser o Thr en el residuo de Kabat 30 en el FR1 de cadena pesada
- 50 • un residuo hidrofóbico, por ejemplo Phe, Tyr o His en el residuo de Kabat 49 en el FR2 de cadena ligera.

Materiales y Métodos del Ensayo**Células HEK EBNA**

5 Las células HEK EBNA (ATCC cat núm. CRL-10852) se obtuvieron de Invitrogen.

Concentraciones de IL-17

10 En todos los ensayos descritos más abajo y en otros lugares en la presente descripción, las concentraciones de IL-17A u homólogos de la IL-17 se refieren a la concentración del homodímero de IL-17 enlazado por disulfuro.

Ensayo de unión ligando-receptor HTRF®

15 Los resultados de la selección se tamizaron en un formato de ensayo de unión receptor-ligando HTRF® (Fluorescencia homogénea de resolución temporal) para la inhibición de la unión ya sea de la IL-17A humana biotinilada (Peprotech 200-17), o la IL-17A humana etiquetada con HIS FLAG (derivada de HEK EBNA propia) a la proteína de fusión IL-17RA Fc (R & D Systems 177-IR).

20 Un ensayo de HTRF® (Fluorescencia homogénea de resolución temporal), es una tecnología de ensayo homogéneo que usa la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia entre un fluoróforo donante y uno aceptor que están en proximidad cercana. Tales ensayos se pueden usar para medir interacciones macromoleculares por acoplamiento directo o indirecto de una de las moléculas de interés a un fluoróforo donante, europio (Eu3+) criptato, y el acoplamiento de la otra molécula de interés a un fluoróforo aceptor XL665, (una alofocianina estable entre cruzada). La excitación de la molécula de criptato (a 337 nm) resulta en fluorescencia de emisión a 620nm. La energía de esta emisión se puede transferir a XL665 en estrecha proximidad al criptato, lo que resulta en la emisión de una fluorescencia de larga vida específica (a 665 nm) a partir de XL665. Se miden las señales específicas de ambos donante (a 620 nm) y l aceptor (a 665 nm), lo que permite el cálculo del índice 665/620 nm que compensa por la presencia de compuestos coloreados en el ensayo. Los resultados se tamizaron como scFv crudos no diluidos (aislamiento guía) o diluidos (optimización guía), que contienen extractos periplasmáticos preparados en; 50 mM de tampón MOPS pH7.4, 0.5 mM EDTA y 0.5 M sorbitol. 3 nM de IL-17A humana biotinilada (6 nM monomérica) o 3 nM de IL-17A humana etiquetada con HIS FLAG (6 nM monomérica) se pre-incubaron por 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad, con 3.2 nM criptato de estreptavidina (CIS Bio International 610SAKLB), o 1.6 nM de IgG anti-flag IgG etiquetada con criptato (CIS Bio International 61GF2KL) respectivamente. Todas las diluciones se realizaron en 50 mM de tampón HEPES que contenía 0.4 M de fluoruro de potasio y 0.1% BSA (tampón de ensayo). En paralelo, 12 nM de la proteína de fusión Fc IL-17RA se pre-incubaron por 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad, con 40 nM de anticuerpo Fc anti-humano marcado con XL665 (CIS Bio International 61HFCXLA) en tampón de ensayo.

40 Después de la pre-incubación de los reactivos, 10 µl de la muestra de scFv cruda se añadió a una placa de ensayo de poco volumen de 384 pocillos (Costar 3676). Esto fue seguido por la adición de 5 µl de la mezcla del receptor pre-incubado y anti-Fc XL665, y después 5 µl de IL-17A humana y de la mezcla de detección de criptato.

La concentración final de IL-17A usada en estos ensayos fue 0.75 nM.

45 Las placas de ensayo después se centrifugaron a 1000rpm a temperatura ambiente por 1 min, y se incubaron por hasta 5 h a temperatura ambiente, antes de leer la fluorescencia resuelta en el tiempo a las longitudes de onda de emisión 620 nm y 665 nm por medio del uso de un lector de placas EnVision (Perkin Elmer).

50 Los datos se analizaron mediante el cálculo de los valores de % Delta F para cada muestra. Delta F se determinó de acuerdo a la ecuación 1.

Ecuación 1:

$$\% \text{ Delta F} = \frac{(\text{valor relación } 665\text{nM}/620\text{nM} \text{ muestra}) - (\text{valor relación } 665\text{nM}/620\text{nM} \text{ control no específico})}{(\text{valor relación } 665\text{nM}/620\text{nM} \text{ control no específico})} \times 100$$

55 Los valores de % de Delta F se usaron posteriormente para calcular el % de unión específica como se describe en la ecuación 2.

60

Ecuación 2:

$$\% \text{ unión específica} = \frac{\% \Delta F \text{ de la muestra}}{\% \Delta F \text{ de l control de unión total}} \times 100$$

5

Los scFv purificados a partir de clones positivos del tamizaje se evaluaron en ambos ensayos HTRF® para la inhibición de la unión de IL-17A al receptor de IL-17. Una titulación de las concentraciones de scFv se usó para establecer la potencia del clon que se midió por valores de IC₅₀ en el ensayo. Los valores de IC₅₀ se determinaron por medio del uso del programa GraphPad Prism por ajuste de la curva por medio del uso de una ecuación logística de cuatro parámetros (Ecuación 3).

10

Ecuación 3:

$$Y = \text{Base} + (\text{Parte superior} - \text{Base}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{Pendiente})})$$

15

X es el logaritmo de la concentración. Y es unión específica. Y comienza en la base y va a la parte superior con forma sigmoide.

Una referencia del Acm anti-IL-17 (Biosource) se incluyó en todos los ensayos como control positivo.

20

Ensayo de competencia de epítomos HTRF® para la inhibición de la unión de la HIS FLAG IL-17A humana al anticuerpo anti-IL-17A humana

Este ensayo de competencia del epítopo puede usarse para determinar la competencia entre los miembros de unión para la unión a IL-17A. Este ensayo puede usarse además para determinar la reactividad cruzada de los miembros de unión para la unión de IL-17A de diferentes especies, por ejemplo, IL-17A humana y cinomolgo, y/o la reactividad cruzada de los miembros de unión a otros miembros de la familia de IL-17, por ejemplo, homólogos A a F de IL-17. Los miembros de unión probados en este ensayo están normalmente en formato scFv, aunque la persona experta puede adaptar el ensayo para usar IgG u otros formatos del miembro de unión. Generalmente, las concentraciones de los reactivos variarán dependiendo de la afinidad del anticuerpo para IL-17A.

25

30

2 nM de HIS FLAG IL-17A humana (4 nM monomérico) se pre-incubaron por 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad, con 1.6 nM anti-flag IgG marcado con criptato. Todas las diluciones se prepararon en tampón de ensayo. En paralelo, 0.6 nM anti-IL-17 IgG1 (contra el cual se probó la competencia de un miembro de unión de prueba) se pre-incubó por 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad, con 20 nM del anticuerpo Fc anti-humano marcado con XL665 en tampón de ensayo.

35

Después de la pre-incubación de los reactivos, 10 µl de la muestra se añadieron a una placa de ensayo de poco volumen de 384 pocillos por duplicado. Esto fue seguido por la adición de 5 µl de la mezcla de IL-17A humana HIS FLAG pre-incubada y criptato anti-Flag, y después 5 µl del anticuerpo IL-17 anti-humano y mezcla de detección XL665.

40

Las placas de ensayo después se centrifugaron a 1000 rpm a temperatura ambiente por 1 min, y se incubaron por hasta 2 h a temperatura ambiente, antes de leer la fluorescencia resuelta en el tiempo a las longitudes de onda de emisión 620 nm y 665 nm por medio del uso de un lector de placas EnVision (Perkin Elmer).

45

Los datos se analizaron calculando los valores de % Delta F para cada muestra, los que se usaron después para determinar el % de unión específica.

Los valores IC₅₀ se determinaron usando el software GraphPad Prism.

50

Para la discusión de los ensayos HTRF generalmente, ver el método para ensayo de unión receptor -ligando HTRF®.

Ensayo de liberación de IL-6 inducida por HT1080 IL-17

Células HT1080 (Colección Europea de Cultivos de células, ECACC - disponible bajo ECACC núm. 85111505) se sembraron en placas de ensayo de cultivo de tejido de fondo plano de 96-pocillos (Costar) a 5 x 10⁴ células/pocillo. Las células se cultivaron después toda la noche en 200 µl medio de ensayo (Medio Mínimo Esencial

55

(MEM) con sales Earles y L-glutamina (Invitrogen), 10% (v/v) suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) (Invitrogen), 1% (v/v) aminoácidos no esenciales-MEM sin L-glutamina (Invitrogen)) en una atmósfera humidificada a 37°C y 5% CO₂.

Se preparó una titulación de scFv purificado/IgG en salina amortiguada con fosfato (PBS) y se pre-incubó con IL-17A (1 nM concentración final) en medio del ensayo por 30-60 min a 37°C. En paralelo se aspiró el medio de las células y se añadieron 100 µl/pocillo del medio del ensayo. A esto se añadieron 100 µl/pocillo de las muestras y se incubaron durante la noche (18 h ± 4h). Los sobrenadantes se cosecharon y se ensayaron inmediatamente o se conservaron a -20°C.

Los niveles de IL-6 en los sobrenadantes se determinaron por medio del uso de kits de ELISA para IL-6 DuoSet (R & D Systems). Se llevó a cabo el ELISA en placas FluoroNunc Maxisorb recubiertas durante la noche con 2 µg/ml de anticuerpo de captura de IL-6 (Ab) (diluido en PBS, 100 µl/pocillo). Las placas de ELISA se lavaron tres veces con PBS-Tween y se añadieron 300 µl del diluyente del reactivo (1% albúmina de suero bovino (BSA) en PBS). Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente (RT) las placas de ELISA se lavaron como se describió previamente. Durante el período de 1 h de incubación el medio condicionado se centrifugó a 1200 rpm por 5 min para eliminar los restos de células. A continuación del lavado de la placa y la preparación del medio condicionado los estándares de IL-6 (intervalo de concentración 1000 pg/ml - 1 pg/ml) y 170 µl de medio condicionado se añadieron a las placas de ELISA y se incubaron a temperatura ambiente por 90 min.

A continuación de la incubación, las muestras se eliminaron y las placas se lavaron como anteriormente. El Ab de detección de IL-6 a 200 ng/ml en diluyente reactivo (100 µl/pocillo) se añadió después a las placas y se incubó a temperatura ambiente por 60 min. Las placas se lavaron después como anteriormente y 100 µl de estreptavidina europio se diluyeron 1:1000 en tampón de ensayo DELFIA® (Perkin Elmer) y se incubaron a temperatura ambiente por 60 min. Las placas de ELISA se lavaron siete veces con tampón de lavado DELFIA® y se añadieron 100 µl de intensificador DELFIA® (Perkin Elmer). La fluorescencia se cuantificó a 615 nm por medio del uso del lector de placas Victor (Perkin Elmer) según las instrucciones del fabricante.

Los datos se analizaron en Excel (Microsoft) por la generación de curvas estándar de IL-6 para cada placa y por medio del uso de estas para calcular la cantidad de IL-6 presente en cada pocillo. El dato de inhibidor se normalizó además al porcentaje de la liberación de IL-6 máxima por medio del uso de los valores de IL-6 en ausencia del inhibidor control y ningún control de IL-6. Se llevaron a cabo análisis adicionales en Prism (GraphPad) donde los datos se graficaron como % de la respuesta control contra el logaritmo de la concentración de scFv/IgG. La determinación de los valores IC₅₀ se calculó por medio del uso del software de ajuste de curvas Prism (Graphpad).

Ensayo de células HT1080 que mide la liberación sinérgica de IL-6

Este ensayo es una modificación del ensayo de liberación de IL-6 de HT1080 inducida por IL-17, en el cual la IL-6 se produce sinérgicamente en respuesta a la adición de IL-17A humana, y TNFα humano (R&D Systems).

Se preparó una titulación de scFv purificado/IgG en salina tamponada con fosfato (PBS) y se pre-incubó con IL-17A (concentración final de IL-17 125 pM) en medio del ensayo por 30-60 min a 37°C. En paralelo se aspiró el medio de las células y se añadieron 100 µl/pocillo de medio del ensayo que contenía TNFα humano (concentración final de TNFα de 25pM). A esto se añadieron 100 µl/pocillo de las muestras y se incubaron durante la noche (18 h ± 4h). Los sobrenadantes se cosecharon y se ensayaron inmediatamente o se conservaron a -20°C.

Los niveles de IL-6 se midieron por ELISA, y los datos se analizaron como se describió previamente para el ensayo de liberación de IL-6 de HT1080 inducida por IL-17.

Generación de IL-17A nativa y efectos de los anticuerpos en la producción de IL-6 de células HT1080 inducida por medio condicionado de células T

200 ml de sangre humana se recogieron en bolsas de sangre con heparina a partir de tres donantes. La sangre se estratificó en linfoprep (30 ml de sangre en 15 ml linfoprep en tubos Greiner Leucosep) y se centrifugó (2000 rpm, 20 min, temperatura ambiente, sin freno). El plasma se separó a un tubo fresco, se centrifugó, y se usó para preparar 5% plasma autólogo estéril en 0.9% salina estéril. La capa de células mononucleares (PBMC) en la interfase se separó en cuatro tubos de centrifuga de 50 ml, y el volumen de cada tubo se duplicó con medio (RPMI suplementado con 10% hiFCS, glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (0.1 mg/ml) y 1% aminoácidos no-esenciales).

Los PBMCs se centrifugaron (1800 rpm, 10 min, temperatura ambiente), y los precipitados de células se resuspendieron en - 15 ml 5% plasma y se agruparon para cada donante. Los PBMCs se lavaron tres veces (1000 rpm, 10 min) en 5% plasma con el objetivo de reducir el número de plaquetas, y después se resuspendieron en 2 ml de medio.

Los PBMCs se añadieron a columnas de lana de nailon n (Polysciences #425A, antes de usarse, empapadas en medio y

calentadas a 37°C) y se incubaron (1 h, 37°C). 20 ml de medio se añadieron después gota a gota a la columna, y el efuente, que contiene las células-T purificadas, se recogió.

5 Las células T se estimularon a 5×10^6 células/ml final en presencia de anti-CD3/anti-CD28 (Sigma, ambos 1 µg/ml final) TGFβ (R & D Systems, 5 ng/ml), IL-23 (R & D Systems, 50 ng/ml), anti-IFNγ (R & D Systems, 10 µg/ml) y un reticulador de carnero anti IgG de ratón (Sigma, 4 µg/ml). Se esperó 15 minutos después de la adición de anti-CD3/anti-CD28 antes de la adición del reticulador. Las células T se estimularon por 48 h a 37°C. Las células se centrifugaron (10 00 rpm, 5 min) y se eliminaron los sobrenadantes.

10 Las células HT1080 se sembraron durante la noche a 1.5×10^4 células/pocillo en una placa de 96 pocillos (Costar) en medio (DMEM suplementado con 10% hiFCS, glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina (0.1 mg/ml) y 1% aminoácidos no-esenciales) en una atmósfera humidificada a 37°C y 5% CO₂.

15 Las titulaciones de los anticuerpos se prepararon en medio como anteriormente. Volúmenes iguales de soluciones de anticuerpos se mezclaron con medio condicionado de células T y se incubaron (37°C, 1 h). El medio se eliminó de las células y se reemplazó con soluciones de anticuerpos y las células se incubaron durante la noche. Los sobrenadantes se cosecharon y almacenaron a -20°C hasta el análisis por medio del uso del ELISA de IL-6 como se describió (Cytoset, Biosource). Los valores de IL-6 se graficaron por medio del uso de Origin v7.5 (OriginLab Corporation) para calcular los valores de IC₅₀ para la inhibición de la liberación de IL-6 en comparación con las respuestas en ausencia de anticuerpo.

20 Ensayo de liberación de IL-6/IL-8/MMP13/PGE₂ de condrocitos

25 El cartilago se obtuvo después del remplazo de articulación de la rodilla de pacientes con osteoporosis bajo la aprobación de los comité de ética locales. Las muestras se digirieron durante la noche en 2 mg/ml de colagenasa a 37°C. Después de la digestión, los condrocitos se expandieron en frascos de cultivo que contienen medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con 10% suero fetal de ternera, penicilina (100 unidades), estreptomycinina (0.1 mg/ml), L-glutamina (2 mM), anfotericina B (2.5 µg/ml) y aminoácidos no-esenciales (1X). Cuatro líneas celulares separadas se cultivaron y usaron en el pase 1. Los condrocitos se cosecharon, se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 1.5×10^4 células/pocillo en medio de cultivo y se dejaron adherir durante la noche a 37°C, 5% CO₂.

30 Los anticuerpos anti-IL-17A se diluyeron en medio del ensayo (medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con 2% suero fetal de ternera, penicilina (100 unidades), estreptomycinina (0.1 mg/ml), L-glutamina (2 mM), y aminoácidos no-esenciales (1X)) en un intervalo de concentraciones (que varían desde 0.08 a 400 nM). La IL-17A humana recombinante (propia o derivada de E. coli Peprotech) se diluyó en medio del ensayo y se evaluó a concentraciones finales de 0.2 y 2 nM. 35 La IL-17A recombinante se añadió a las soluciones de anticuerpos anti-IL-17 y se pre-incubó por 1 h. El medio se eliminó de los condrocitos y se añadieron 100µl de la mezcla IL-17 recombinante/anticuerpo anti-IL-17A. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron después de una incubación de 24 h. La IL-6, IL-8, MMP13 y PGE₂ humanas se midieron por ELISA.

40 ELISA para la detección de la producción de IL-6 humana:
La IL-6 se midió por ELISA, Cytoset (Biosource, CHC1264) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las placas de ELISA se recubrieron con un anticuerpo monoclonal IL-6 (1 µg/ml) durante la noche a 4°C y se bloquearon con 1% BSA/tampón bicarbonato. Las placas se lavaron con PBS/0.05% Tween 20 y se incubaron con sobrenadantes de cultivo de condrocitos humanos y un anticuerpo anti-huIL-6 conjugado a biotina (0.4 µg/ml) por 2 h a temperatura ambiente. Después del lavado, la IL-6 se detectó por medio del uso de estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante (1:2500). Las placas se revelaron por medio del uso de 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina. La reacción se paró con 2 M H₂SO₄, y las densidades ópticas se determinaron a 450 nm por medio del uso de un lector de placas PHERAstar.

45 ELISA para la detección de la producción de IL-8 humana:
50 La IL-8 se midió por ELISA, Cytoset (Biosource, CHC1304) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las placas de ELISA se recubrieron con un anticuerpo monoclonal IL-8 (1 µg/ml) durante la noche a 4°C y se bloquearon con 1% BSA/tampón bicarbonato. Las placas se lavaron con 0.05% Tween 20/PBS y se incubaron con sobrenadantes de cultivo de condrocitos humanos y un anticuerpo anti-huIL-8 conjugado a biotina (0.1 µg/ml) por 2 h a temperatura ambiente. Después del lavado, la IL-8 se detectó por medio del uso de estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante (1:5000). Las placas se revelaron por medio del uso de 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina. La reacción se paró con 2 M H₂SO₄, y las densidades ópticas se determinaron a 450 nm por medio del uso de un lector de placas PHERAstar.

55 ELISA para la detección de la producción de MMP13 humana:
Las placas de ELISA se recubrieron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-huMMP13 (R & D Systems, MAB511: 1 µg/ml) en tampón fosfato durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con 2%BSA / tampón fosfato seguido de lavado con 0.05% Tween 20/PBS y se incubaron con sobrenadantes de cultivo de condrocitos humanos más anticuerpo policlonal

60

de conejo anti-huMMP13 (Abcam 9128: 1:2500 dilución) por 2 h a 37°C. Después del lavado, la MMP13 se detectó por medio del uso de anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rábano picante (Amersham Biosciences NA934: 1:2500). Las placas se revelaron por medio del uso de 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina. La reacción se paró con 2M H₂SO₄, y las densidades ópticas se determinaron a 450 nm por medio del uso de un lector de placas PHERAstar.

5 ELISA para la detección de la producción de PGE₂ humana:

Las placas de ELISA se recubrieron con un anti-IgG de conejo de ratón (Sigma, R2004: 10 µg/ml) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron con 0.05% Tween 20/PBS y se incubaron con sobrenadantes de cultivo de condrocitos humanos, Trazador de Prostaglandina AChE (Cayman Chemicals, 414010) y antisuero PGE₂ (preparado propio, 1:50,000) durante la noche a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas se revelaron por medio del uso del reactivo de Ellman (Cayman chemicals, 400050) y las densidades ópticas se determinaron a 405 nm por medio del uso de un lector de placas PHERAstar.

10 Ensayo de sinergia de IL-17 en explantes de cartílago post-mortem.

15 Muestras de rodilla post-mortem se obtuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), del hospital Kings Mill, Nottingham con aprobación ética total. Cada rodilla se disectó por medio del uso de un bisturí #22 en condiciones estériles. El cartilago se aisló como una pieza de profundidad completa donde fue posible. Los explantes de disco se cortaron por medio del uso de barrenadores de corcho (5 mm) y se sembraron 1 explante por pocillo de una placa de 96 pocillos en 220 µl de medio (DMEM (libre de rojo de fenol) suplementado con penicilina (100 U/ml) estreptomycin (0.1 mg/ml) glutamina (2 mM), 1% aminoácidos no-esenciales y gentamicina (1 µg/ml)). Los explantes descansaron por 3 días antes de la estimulación. Cada condición tenía 12 explantes replicados.

20 Los estímulos usados fueron medio solo, IL-17A (Peprotech) a 10 ng/ml, TNFα (Peprotech) a 1 ng/ml solo o en combinación todo diluido en medio que contiene sulfato de polimixina B (2 µg/ml). Los anticuerpos neutralizantes de la IL-17A y sus controles de isotipo (IgG₁ de ratón (R & D Systems), IgG₁ humana CAT002 (Cambridge Antibody Technology Limited)) se diluyeron en medio que contenía 2 µg/ml de polimixina B a 50 nM para los experimentos iniciales y desde 0.5 a 50 nM para los experimentos de IC₅₀. Los anticuerpos se mezclaron con citocinas donde se indicó y todas las soluciones se incubaron antes de la adición a los explantes (37°C, 30 min).

25 El medio se eliminó de los explantes y se reemplazó con 220 µl de medio de estimulación. Las placas se incubaron por 72 h (37°C, atmósfera humidificada) antes de separar los sobrenadantes para almacenarlos a -20°C. El contenido de IL-6 se analizó por ELISA (Cytoset, Biosource) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y como se describió en el Ejemplo 3 (Afinidad de los anticuerpos por la IL-17A humana). Los valores se calcularon por medio del uso de Origin v7.5 (OriginLab Corporation).

30 Ensayo de sinergia de IL-17A en fibroblastos sinoviales de OA

35 Se obtuvieron muestras de rodilla con osteoartritis a partir de reemplazos totales de rodilla en DMEM del Hospital Kings Mill, Nottingham con aprobación ética total. Cada rodilla se disectó por medio del uso de un bisturí #22 en condiciones estériles. El sinovio inflamado se diseccionó de la articulación y se colocó en el frasco estéril T75cm². Las piezas de sinovio se incubaron por 24 h en solución de colagenasa (2 mg/ml) en DMEM, suplementado con penicilina (100 U/ml) estreptomycin (0.1 mg/ml) glutamina (2 mM), 1% aminoácidos no-esenciales y anfotericina B (2.5 µg/ml) en una incubadora humidificada mantenida a 37°C.

40 La suspensión de células del sinovio digerido se coló, lavó y las células se cultivaron en DMEM, suplementado con penicilina (100 U/ml) estreptomycin (0.1 mg/ml) glutamina (2 mM), 1% aminoácidos no-esenciales y anfotericina B (2.5 µg/ml) en una incubadora húmidificada mantenida a 37°C. Las células se pasaron cada 1-2 semanas y se usaron en el pase 2. Las células se despegaron del frasco por medio del uso de tripsina-EDTA y se sembraron en una placa de 96 pocillos a 1.5 x 10⁴ células por pocillo y se usaron 1 día después de sembradas.

45 Los estímulos que se usaron fueron medio solo, IL-17A (Peprotech), TNFα (Peprotech) ya sea solos o en combinación. Los anticuerpos neutralizantes de la IL-17A y sus controles de isotipo (IgG₁ de ratón (R & D Systems), IgG₁ humana CAT002 (Cambridge Antibody Technology Limited)) se diluyeron en medio que contenía 1 µg/ml de polimixina B a 50 nM. Los anticuerpos se mezclaron con citocinas donde se indicó y todas las soluciones se incubaron antes de la adición a los explantes (37°C, 30 min).

50 El medio se eliminó de los explantes y se reemplazó con 100 µl de medio de estimulación. Las placas se incubaron por 24 h (37°C, atmósfera humidificada) antes de separar los sobrenadantes para almacenarlos a -20°C. El contenido de IL-8 se analizó por ELISA (Cytoset, Biosource) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y como se describió en el Ejemplo 3

(Afinidad de los anticuerpos por la IL-17A humana). Los valores se calcularon por medio del uso de Origin v7.5 (OriginLab Corporation).

Inhibición de la IL-8 inducida por IL-17A e IL-17A/ TNF α / en fibroblastos sinoviales RA

Muestras de rodillas de artritis reumatoide de reemplazos totales de articulación se obtuvieron en AstraZeneca R&D Charnwood, con aprobación ética total. Los fibroblastos sinoviales RA se dieron a AstraZeneca R&D Alderley Park en el pase 2. Las células se cultivaron en frascos T225 cm² en DMEM, suplementado con 10% FCS (Hyclone), penicilina (100 U/ml) estreptomycin (0.1 mg/ml) glutamina (2 mM), 1% aminoácidos no-esenciales y gentamicina (1 μ g/ml) en una incubadora humidificada mantenida a 37°C.

Las células se pasaron cada 1-2 semanas y se usaron en el pase 5. Las células se despegaron del frasco por medio del uso de tripsina-EDTA y se sembraron en una placa de 96 pocillos a 5 x 10³ células por pocillo y se usaron 3 días después de sembradas.

Los estímulos usados fueron medio solo, IL-17A (Peprotech), ya sea sola o en combinación con TNF α (R&D Systems). Los anticuerpos neutralizantes de la IL-17A y sus controles de isotipo (IgG1 de ratón (R & D Systems), IgG1 humana CAT002 (Cambridge Antibody Technology Limited)) se diluyeron en medio que contenía 1 μ g/ml de polimixina B a 50 nM. Los anticuerpos se mezclaron con citocinas donde se indicó y todas las soluciones se incubaron antes de la adición a los explantes (37°C, 30 min).

El medio se eliminó de los explantes y se reemplazó con 100 μ l de medio de estimulación. Las placas se incubaron por 24 h (37°C, atmósfera humidificada) antes de separar los sobrenadantes para almacenarlos a -20°C. El contenido de IL-8 se analizó por ELISA (Cytoset, Biosource) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y como se describió en el Ejemplo 3 (Afinidad de los anticuerpos por la IL-17A humana). Los valores de la IL-8 se graficaron para generar los valores de IC₅₀ que se calcularon por medio del uso de Origin v7.5 (OriginLab Corporation).

Análisis pA_2

La herramienta farmacológica principal para cuantificar la afinidad de un antagonista competitivo es el análisis de Schild. Por medio del uso de este enfoque de un medio independiente del sistema de estimación de la afinidad de los antagonistas en un ensayo funcional se puede determinar. El método se basa en el concepto de que la concentración de antagonista y su afinidad determinan el antagonismo de la respuesta agonista. Debido a que el antagonismo se puede cuantificar y la concentración del antagonista se conoce, la afinidad del antagonista se puede determinar. Este antagonismo se cuantifica mediante la medición de la relación de concentraciones equiactivas de los agonistas, medido en presencia y ausencia del antagonista, denominadas proporciones de dosis (DR).

Las relaciones de dosis se pueden calcular tomando la relación de EC₅₀ del agonista (típicamente IL-17A) en ausencia del miembro de unión a la EC₅₀ del agonista en presencia de una concentración única del miembro de unión. Las relaciones de dosis, expresadas como log(DR-1) después se pueden usar en una regresión lineal en log[miembro de unión] para producir una regresión de Schild. Así, para cada concentración del miembro de unión habrá un correspondiente valor de DR; estos se representan gráficamente como la regresión de log (DR-1) sobre log [miembro de unión]. Si el antagonismo es competitivo, habrá una relación lineal entre log (DR-1) y log [miembro de unión] de acuerdo con la ecuación Schild en donde la ecuación es la siguiente

$$\text{Log (DR-1)} = \text{log [B]} - \text{log } K_B$$

[B] es la concentración molar del miembro de unión.

Bajo estas circunstancias, un valor de cero para la ordenada dará un intercepto del eje-x en donde log [B] = log K_B. Por lo tanto la concentración del miembro de unión que produce log (DR-1) = 0 será igual al log K_B, la constante de equilibrio de disociación del complejo miembro de unión - receptor. Esta es una cuantificación independiente del sistema para la estimación de la afinidad del miembro de unión. Tradicionalmente, este enfoque se usa para determinar la afinidad del antagonista del receptor, sin embargo basado en suposiciones similares para la neutralización del ligando, un cálculo de intervalo de dosis debe permitir la estimación de la afinidad del miembro de unión para neutralizar la actividad de la IL-17 en las células además. Debido a que los valores de K_B de obtienen de un gráfico logarítmico, ellos tienen una distribución logarítmica normal. El logaritmo negativo de esta concentración particular se refiere empíricamente como pA_2 , la concentración del antagonista que produce un cambio de dos veces de la curva de dosis respuesta del agonista. La potencia del antagonista se puede cuantificar calculando pA_2 a partir de una única concentración de antagonista que produce un único valor para la relación de dosis a partir de la ecuación, en donde

$$pA_2 = \log (DR-1) - \log [B]$$

[B] = la concentración molar del antagonista que hace necesario duplicar la concentración de agonista para provocar la respuesta submáxima original.

DR = la relación de la dosis se cuantifica mediante la medición de la relación de concentraciones equiactivas del agonista medida en presencia y ausencia del antagonista.

La pA_2 se puede calcular a partir de los datos del ensayo de dosis-respuesta.

Método de ensayo usado para el análisis de pA_2 para calcular la afinidad de los anticuerpos por la IL-17A humana

Las células HT1080 (Colección Europea de Cultivos de células, ECACC) se sembraron en placas de ensayo de cultivo de tejido de fondo plano de 96-pocillos (Costar) a 5×10^4 células/pocillo. Las células después se cultivaron durante la noche en 200 μ l de medio del ensayo (MEM con sales Earles y L-glutamina, 10% (v/v) FBS Australiano inactivado por calor, 1% (v/v) aminoácidos no-esenciales MEM (sin L-glutamina), Invitrogen)) / pocillo en atmósfera humidificada a 37°C y 5% CO₂.

Una titulación de la IL-17A (intervalo de concentración final 1 μ M a 7 pM) se preparó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se pre-incubó con IgG purificada (intervalo de concentración final del Ab usado 270 nM a 270 pM) en medio de ensayo por 30-60 min a 37 °C. En paralelo se aspiró el medio de las células y se añadieron 100 μ l/pocillo del medio del ensayo. A esto se añadieron 100 μ l/pocillo de las muestras y se incubaron durante la noche (18 h \pm). Los sobrenadantes se cosecharon y se ensayaron inmediatamente o se conservaron a -20°C.

Los niveles de IL-6 en los sobrenadantes se determinaron por medio del uso de kits de ELISA para IL-6 DuoSet (R & D Systems). Se llevó a cabo el ELISA en placas FluoroNunc Maxisorb recubiertas durante la noche con 2 μ g/ml de anticuerpo de captura de IL-6 (Ab) (diluido en PBS, 100 μ l/pocillo). Las placas de ELISA se lavaron tres veces con PBS-Tween y se añadieron 300 μ l del diluyente del reactivo (1% albúmina de suero bovino (BSA) en PBS). Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente (RT) las placas de ELISA se lavaron como anteriormente. Durante el período de 1 h de incubación el medio condicionado se centrifugó a 1200 rpm por 5 min para eliminar los restos de células. A continuación del lavado de la placa y la preparación del medio condicionado los estándares de IL-6 (intervalo de concentración 1000 pg/ml - 1 pg/ml) y 170 μ l de medio condicionado se añadieron a las placas de ELISA y se incubaron a temperatura ambiente por 90 min. A continuación de la incubación, las muestras se eliminaron y las placas se lavaron como anteriormente. El Ac de detección de IL-6 a 200ng/ml en el diluyente reactivo (100ml/pocillo) se añadió después a las placas y se incubó a temperatura ambiente por 60 min. Las placas se lavaron después como anteriormente y 100 μ l de estreptavidina europeo se diluyeron 1:1000 en tampón de ensayo DELIA® (Perkin Elmer) y se incubaron a temperatura ambiente por 60 min. Las placas de ELISA se lavaron siete veces con tampón de lavado DELFIA y se añadieron 100 μ l de intensificador DELFIA (Perkin Elmer). La fluorescencia se cuantificó a 615nm por medio del uso del lector de placas Víctor (Perkin Elmer) según las instrucciones del fabricante.

Los datos se analizaron en Excel (Microsoft) por la generación de curvas estándar de IL-6 añadidas para cada placa y por medio del uso de estas para calcular la cantidad de IL-6 presente en cada pocillo. Las curvas dependientes de la concentración se normalizaron al porcentaje de liberación máxima de IL-6 por medio del uso de los valores de IL-6 en ausencia del inhibidor control. Análisis adicionales se llevaron a cabo en Prism (GraphPad Software) donde los datos se graficaron como % de la respuesta del control contra el logaritmo de la concentración de IgG y los valores de IC₅₀ se generaron por medio del uso del software Prism de ajuste de curvas (Graphpad). Las laderas de la curva dependiente de la concentración se promediaron y fijaron para calcular los intervalos de dosis. Estos se usaron para generar gráficos Schild (además en Prism) y estimar los valores de Kd a partir de los valores de pA_2 .

Perturbación del índice de intercambio H/D de la IL-17A por los miembros de unión

La IL-17A etiquetada se usó a 0.5 mg/ml en 50 mM Tris.HCl pH7.4, 150 mM NaCl. El anticuerpo se usó a 10.6 mg/ml en PBS (1.54 mM KH₂PO₄, 2.71 mM Na₂HPO₄, 155 mM NaCl pH7.2). El anticuerpo se acopló a la resina POROS AL (Applied Biosystems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante para preparar una columna de 100 μ l la cual se mantuvo a 1°C.

La columna se lavó en 50 mM Tris.HCl pH7.5, 150 mM NaCl preparado en 75% D₂O. La IL-17A se diluyó en tampón preparado con 75% D₂O a 0.125 mg/ml y se incubó por 150, 500, 1500 y 5000s antes de inyectar el anticuerpo en la columna. La columna se lavó rápidamente con 0.2 ml de tampón en H₂O y después se incubó por el mismo período de tiempo es decir la muestra se intercambió en D₂O por 150s y se intercambió de nuevo a H₂O por 150s y similarmente para las muestras a 500, 1500 y 5000s. Los diferentes momentos se eluyeron al inyectar primero 80 μ l y después 40 μ l de 0.8%

ácido fórmico. Los últimos 40µl se recogieron y se añadieron 20µl de 2 M urea, 1 M TCEP pH3 a 1°C. La mezcla total se inyectó en una columna de 100µl que contiene pepsina para digerir la proteína en péptidos que se separaron por rpHPLC por medio del uso de un gradiente de acetonitrilo desde 12-28.5% y las masas se determinaron en el espectrómetro de masa electroasporador Thermo Finnigan y un espectrómetro de masa Micromass Q-TOF. El programa software SEQUEST (Thermo Finnigan San Jose, CA) se usó para identificar secuencias de los iones de péptidos parentales.

El efecto del anticuerpo sobre el índice de intercambio de diferentes partes de la IL-17 se determinó esencialmente como se describió anteriormente, con las siguientes excepciones: la IL-17 se diluyó primero en 0.125mg/ml en H₂O que contenía tampón, después se inyectó en la columna la cual se prelavó con 50 mM Tris.HCl pH7.5, 150 mM NaCl preparado en H₂O. Después de la unión, la columna se lavó con 50 mM Tris.HCl pH7.5, 150 mM NaCl preparado en H₂O y después se incubó con 50 mM Tris.HCl pH7.5, 150 mM NaCl preparado en 75% D₂O por 150, 500, 1500 y 5000s antes de intercambiarse de vuelta en H₂O y se trató como anteriormente.

Clonación, expresión y purificación del constructo mutante de IL-17A

La IL-17A mutante se clonó con una etiqueta de histidina C-terminal por medio del uso de la tecnología Gateway® (Invitrogen) y métodos convencionales de mutagénesis (por medio del uso del kit de mutagénesis en multisitios Stratagene) o la reacción en cadena de la polimerasa. Los genes clonados se insertaron en el vector de expresión pCEP4 por medio del uso de la reacción de la LR Clonasa.

La IL-17A silvestre y mutante con la etiqueta de His C-terminal se expresó en células HEK293/EBNA. Las células se transfectaron con 30µg de ADN por frasco T162 cuando las células estaban 60-70% confluentes. Se usó el reactivo de transfección PEI (de Sigma) y las células se incubaron durante la noche antes de que el medio se eliminara y se reemplazara con medio fresco sin suero y se incubara por 72 horas más. Los sobrenadantes de estas células se recogieron y se usaron para la purificación de cada proteína recombinante.

Se recogió el sobrenadante de las células HEK293/EBNA transfectadas y se ajustó el pH a 7.4 antes de la purificación por cromatografía de afinidad en Ni-Sefarosa de flujo rápido (GE HealthCare). La proteína purificada se dializó en tampón PBS y se analizó por SDS-PAGE, secuenciación N-terminal Edman y transferencia de tipo Western, por medio del uso de anticuerpos anti-histidina como herramientas de detección. La identidad de las proteínas se confirmó antes de comenzar los estudios de unión y funcionales. La concentración se determinó por una combinación de la absorbancia a 280 nm y la intensidad de la tinción por azul Coomassie en SDS-PAGE.

Experimentos de unión en BIAcore de la IL-17A silvestre y mutante

Los anticuerpos a 100 µg/ml se inmovilizaron a la superficie de un chip sensor CM5 (BIAcore Cat #BR-1033-99) por medio del uso de BIAcore 3000 y kit de acoplamiento a amina (BIAcore Cat# BR-1000-50) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores iniciales se generaron por regeneración ácida por medio del uso de 10 mM glicina pH1.5. Antes de cada experimento se establecieron los valores iniciales y los ligandos (a 25 nM) se inyectaron sobre la superficie del chip por 7 minutos a la velocidad de 10 µl/min. La cantidad de IL-17A unida se determinó al medir la señal (RU) 30 s antes y 60 s después de la inyección y sustraer la primera de la última.

Ensayo de liberación de IL-6 de HT1080 inducida por IL-17 (estudios de mapeo epitópico)

Las células HT1080 (Colección Europea de Cultivos de células, ECACC - ECACC núm. 85111505) se sembraron en placas de ensayo de cultivo de tejido de fondo plano de 96-pocillos (Costar) a 5 x 10⁴ células/pocillo. Las células después se cultivaron durante la noche en 200 µl de medio del ensayo (Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con L-glutamina (Invitrogen), 1% penicilina y estreptomina, 10% (v/v) suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) (Hyclone), 1% (v/v) MEM-aminoácidos no-esenciales sin L-glutamina (Invitrogen)) en una atmósfera humidificada a 37°C y 5% CO₂.

Las titulaciones del anticuerpo de interés o las IgG control se prepararon en medio del ensayo (intervalo de concentración final 50 - 0.03 nM) y se pre-incubaron con IL-17A o formas mutantes de la IL-17A (concentraciones finales como se exponen en la Tabla 20b, intervalo 1-2 nM) por 30-60 min a 37°C. Curvas de titulación adicionales de la IL-17A o la IL-17A mutante sola se prepararon para ensayar la respuesta de las células a los ligandos. El medio se aspiró de las células y 100 µl/pocillo del anticuerpo y la IL-17A incubados (o la IL-17A mutante), o la IL-17A sola se añadieron y se incubaron durante la noche (18 h ± 4h). Los sobrenadantes se cosecharon y se ensayaron inmediatamente o se conservaron a -20°C. Los puntos de datos estaban por triplicado en el experimento.

Los niveles de IL-6 en los sobrenadantes se determinaron como se señaló en los materiales y métodos del "ensayo de liberación de IL-6/IL-8/MMP13/PGE₂ de condrocitos".

Los valores desconocidos se extrapolaron de una curva estándar por medio del uso de 'Calibración estándar y cálculos de incógnitas' y las IC₅₀s se calcularon por medio del uso de 'Repuesta a la dosis - 1 - 15 conjuntos' en Origin v7.5 (OriginLab Corporation).

5

Producción y análisis de Fab del Anticuerpo 7 para cristalografía de rayos X

El anticuerpo 7 purificado se digirió para generar fragmentos Fab como sigue:

- Se preparó un tampón de digestión de 30 mM DL-clorhidrato de cisteína disuelto en GIBCO PBS (Invitrogen).
- Papaina de látex de papaya (Sigma) se reconstituyó en tampón de digestión para dar una solución a 10mg/ml y se mantuvo a temperatura ambiente por un mínimo de 30 minutos antes de usarse.
- La cisteína se añadió a la IgG para dar una solución de 30 mM.
- La papaina se añadió a la IgG a un índice de 1mg papaina por 100 mg IgG
- La digestión se terminó después de 4 horas por la adición de 0.5M de yodoacetamida (Sigma) para dar 50 mM yodoacetamida en la mezcla de digestión final.

15

El Fab se purificó después, se intercambié el tampón a PBS pH 7.2 y se concentró a aproximadamente 10 mg/ml para su uso en cristalografía de rayos-X, la cual se describe más abajo.

Determinación de la estructura de rayos-X: Preparación de la proteína, cristalización y cristalografía.

20

La IL-17A humana recombinante se expresó en E. coli y los cuerpos de inclusión se aislaron por medio del uso de métodos bien descritos (Rudolph y otros 1996). La proteína de los cuerpos de inclusión se solubilizó por homogenización en tampón de solubilización (50 mM Tris pH 8.5, 6 M guanidina RCl, 10 mM DTT) a temperatura ambiente por 1 hr. La proteína solubilizada se replegó a una concentración final de 0.5 mg/ml por dilución rápida por la adición gota a gota al tampón de repliegue con agitación vigorosa (0.1 M CAPSO pH 9.5, 0.9 M arginina y 0.3:0.03 mM glutatión reducido:oxidado) a temperatura ambiente y y se dejó reposar durante la noche. La proteína replegada se concentró 5 veces por medio del uso de un cartucho en espiral MWCO de 10 KDa (sistema de flujo tangencial Amicon proflux™ M12). La proteína concentrada se purificó en columnas de exclusión por tamaño S75 (GE Healthcare Biosciences) equilibradas con tampón de exclusión por tamaño (50 mM Tris pH 7.4, 0.15 M NaCl).

25

30

Se llevó a cabo filtración en gel analítica por medio del uso de un Ettan LC (GE Healthcare) ajustado con una columna Superdex 200 PC 3.2/30 (GE Healthcare) con el objetivo de identificar el índice de mezcla que resultaría en el máximo rendimiento del complejo IL-17A / Fab. La columna se equilibró con tampón de filtración en gel (BTP 25 mM, pH 7.0, NaCl 100 mM) antes de cargar 35µl de muestras a 50µlmin⁻¹. Un índice de 3.6:1 IL-17A:Fab produjo el máximo rendimiento del complejo por medio del uso de los materiales descritos. La IL-17A y el Fab se mezclaron juntos en este índice y se concentraron por medio del uso de un concentrador de centrifuga de 500µl con un valor de corte de peso molecular de 30kD (Viva Spin) previamente lavado con 1ml de tampón de filtración en gel. La proteína se concentró a DO280 = 7.6 después de lo cual se separó una alícuota de 50µl. El resto se concentró más aun hasta una DO280 = 16.6. La cristalización por difusión de vapor por gota colgante se llevó a cabo a 20°C por medio del uso de cubetas Nextal y gotas de 2µl + 2µl a las dos concentraciones de proteínas.

35

40

Los cristales con calidad para difracción crecieron después de dos o tres semanas a partir de las gotas colgantes de alta concentración que contenían tampón 90.9 PCTP mM pH 4.0, tampón PCTP 9.1 mM pH 9.5 (1), 100 mM sulfato de amonio, 14% w/v PEG3350. Los cristales se cosecharon, crio-protégieron por medio del uso de (-)(-) butano 2,3 diol (20% v/v en la solución del pocillo correspondiente) y congeladas instantáneamente en un Oxford Cryostream a 100K. Los cristales se tamizaron por su calidad de difracción por medio del uso de un generador anódico de rotación Rigaku FRe equipado con un detector Saturn 944 CCD y una crio cabezal Xstream. Aquellos cristales que mostraron difracción ordenada se almacenaron listos para la recogida de datos en ID-29 en ESRF.

45

50

Los datos de difracción se recogieron de cristales individuales enfriados a100K en la European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), línea de luz ID29, y se empleó un detector ADSC Quantum Q315r. Se registraron dos conjuntos de datos a longitudes de onda de 0.9787 Å sobre un intervalo angular de 225° y 155° en marcos de rotación de 0.75 ° y 0.2°, respectivamente. Los datos de imagen de cada conjunto de datos se integraron con MOSFLM (Leslie, 1991) y se fusionaron y escalaron individualmente con programas del paquete CCP4 (CCP4, 1994). Imágenes con un Rfusión interno de >20% por lote se excluyeron del escalado final. La estadística de los datos recogidos se muestra en la Tabla 23.

55

Todos los cristales pertenecen al grupo de espacio monoclinico P2₁ con dimensiones de células típicas de $a = 98.5 \text{ \AA}$, $b = 66.7 \text{ \AA}$, y $c = 203.8 \text{ \AA}$ con $\beta = 91.7^\circ$. La unidad cristalográfica asimétrica contiene cuatro moléculas de Fab y dos moléculas de IL-17A lo que resulta en un coeficiente de Matthews de $2.68 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ (Matthews, 1968) que corresponde a un contenido de

60

solvente de 54%. La estructura del complejo de IL-17A/Fab se determinó por el método de remplazo molecular por medio del uso del programa MOLREP de CCP4 (CCP4, 1994). En un primer ensayo, 3 moléculas del dominio variable (residuos 2 a 110 de la cadena ligera y residuos 2 a 124 de la cadena pesada) de Fab (generados a partir de la entrada 1AQK de PDB, Faber y otros., 1998) se pudieron posicionar y orientar. Subsecuentemente, las posiciones de estos dominios variables de Fab se fijaron y 3 moléculas de los dominios constantes de Fab (residuos 111 a 216 de la cadena ligera y residuos 125 a 226 de la cadena pesada) se posicionaron y orientaron. Las moléculas de Fab correctamente generadas indicaron que la solución de Remplazo Molecular correcta y permitieron la colocación de la cuarta y última molécula de Fab en la unidad asimétrica de la red cristalina. El refinamiento de la máxima verosimilitud restringida por medio del uso de factores B isotrópicos por medio del uso de REFMAC (Murshudov y otros., 1997) resultó en un $R_{\text{trabajo}}/R_{\text{libre}}$ inicial de 33.6%/41.5%. La reconstrucción manual al modelo de Fab y el remplazo de la secuencia de aminoácidos correcta se llevó a cabo por medio del uso del programa de gráficos moleculares COOT (Emsley & Cowtan, 2004). Las moléculas de IL-17A se identificaron por inspección visual del mapa de densidad electrónica residual de FoFc. Al colocar manualmente las hebras de varias longitudes en densidades electrónicas 2FoFc desocupadas, el motivo de aminoácidos conservado de la IL-17A [50-RSTSPW-57] se reconoció y se pudo modelar sin ambigüedades. Esto permitió la superposición del modelo de la IL-17F (PDB entrada 1JPY, Hymowitz y otros., 2001) lo cual permitió la interpretación rápida de la molécula dimérica. La superposición además dejó claro la parte de la molécula que interactúa con el Fab y que estaba bien ordenada, mientras el extremo opuesto de la molécula dimérica alargada no fue visible en la densidad electrónica, es decir, estaba desordenada. El modelo de la IL-17A se construyó con tanta densidad electrónica como se permitiera. Después de una ronda de refinamiento de la máxima verosimilitud restringida por medio del uso de REFMAC con $R_{\text{trabajo}}/R_{\text{libre}}$ de 27.2%/33.4% se aplicó al homodímero de IL-17A la reconstrucción manual y la colocación de la secuencia de aminoácidos correcta. En una última ronda de MR por medio del uso de MOLREP, la reconstrucción del homodímero de IL-17A (residuos visibles en la densidad electrónica son 39 a 129 de la cadena A y 44 a 132 de la cadena B) se usó para orientar y localizar el segundo homodímero de IL-17A. La estructura del complejo de IL-17A Fab - que contiene 4 moléculas de Fab y 2 moléculas de IL-17A - se refinó para la convergencia por medio del uso de REFMAC antes de añadir manualmente las moléculas de agua y los iones sulfato por medio del uso de COOT. Los factores-R finales, R_{trabajo} y R_{libre} son 22.7% y 28.4%, respectivamente.

Tabla 23 Parámetros del cristal y el procesamiento de los datos de rayos-X y estadísticas de refinamiento

Grupo espacial	$P2_1$
Longitud de onda (Å)	0.9787
Constantes celulares a (Å)	98.5
b (Å)	66.7
c (Å)	203.8
β (°)	91.7
Intervalo de resolución (Å)	102.1 - 2.63
Lámina de máxima resolución (Å)	2.77 - 2.63
Completamiento total (%)	100.0
Lámina de máximo completamiento (%)	100.0
Reflexiones únicas	79235
Multiplicidad	7.0
Lámina de máxima multiplicidad	6.9
Rfusión total (%) ¹	12.8
Lámina de máxima Rfusión (%)	46.0
Rvalor total (%) ²	22.7
Rvalor libre (%)	28.4
$1 R_{\text{fusión}} = \sum_{hkl} (\sum_i I_i - \langle I \rangle) / \sum_i I_i$ $2 R_{\text{valor}} = \sum_{hkl} (F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}) / \sum_{hkl} F_{\text{obs}} $ R_{libre} es el factor R de validación cruzada computado para el conjunto de pruebas de 5% de reflexiones únicas.	

Secuencias

ES 2 399 475 T3

El dominio VH, el dominio VL y las secuencias CDR de los miembros de unión se muestran en la lista de secuencia anexada, en la cual las sec. con núms. de ident. corresponden como sigue:

PTN = Secuencia de aminoácido

1	Anticuerpo 01 VH ADN.	32	Anticuerpo 04 VH PTN
2	Anticuerpo 01 VH PTN	33	Anticuerpo 04 VH CDR1 PTN
3	Anticuerpo 01 VH CDR1 PTN	34	Anticuerpo 04 VH CDR2 PTN
4	Anticuerpo 01 VH CDR2 PTN	35	Anticuerpo 04 VH CDR3 PTN
5	Anticuerpo 01 VH CDR3 PTN	36	Anticuerpo 04 VL ADN.
6	Anticuerpo 01 VL ADN.	37	Anticuerpo 04 VL PTN
7	Anticuerpo 01 VL PTN	38	Anticuerpo 04 VL CDR1 PTN
8	Anticuerpo 01 VL CDR1 PTN	39	Anticuerpo 04 VL CDR2 PTN
9	Anticuerpo 01 VL CDR2 PTN	40	Anticuerpo 04 VL CDR3 PTN
10	Anticuerpo 01 VL CDR3 PTN	41	Anticuerpo 05 VH ADN.
11	Anticuerpo 02 VH ADN.	42	Anticuerpo 05 VH PTN
12	Anticuerpo 02 VH PTN	43	Anticuerpo 05 VH CDR1 PTN
13	Anticuerpo 02 VH CDR1 PTN	44	Anticuerpo 05 VH CDR2 PTN
14	Anticuerpo 02 VH CDR2 PTN	45	Anticuerpo 05 VH CDR3 PTN
15	Anticuerpo 02 VH CDR3 PTN	46	Anticuerpo 05 VL ADN.
16	Anticuerpo 02 VL ADN.	47	Anticuerpo 05 VL PTN
17	Anticuerpo 02 VL PTN	48	Anticuerpo 05 VL CDR1 PTN
18	Anticuerpo 02 VL CDR1 PTN	49	Anticuerpo 05 VL CDR2 PTN
19	Anticuerpo 02 VL CDR2 PTN	50	Anticuerpo 05 VL CDR3 PTN
20	Anticuerpo 02 VL CDR3 PTN	51	Anticuerpo 06 VH ADN.
21	Anticuerpo 03 VH ADN.	52	Anticuerpo 06 VH PTN
22	Anticuerpo 03 VH PTN	53	Anticuerpo 06 VH CDR1 PTN
23	Anticuerpo 03 VH CDR1 PTN	54	Anticuerpo 06 VH CDR2 PTN
24	Anticuerpo 03 VH CDR2 PTN	55	Anticuerpo 06 VH CDR3 PTN
25	Anticuerpo 03 VH CDR3 PTN	56	Anticuerpo 06 VL ADN.
26	Anticuerpo 03 VL ADN.	57	Anticuerpo 06 VL PTN
27	Anticuerpo 03 VL PTN	58	Anticuerpo 06 VL CDR1 PTN
28	Anticuerpo 03 VL CDR1 PTN	59	Anticuerpo 06 VL CDR2 PTN
29	Anticuerpo 03 VL CDR2 PTN	60	Anticuerpo 06 VL CDR3 PTN
30	Anticuerpo 03 VL CDR3 PTN	61	Anticuerpo 07 VH ADN.
31	Anticuerpo 04 VH ADN.	62	Anticuerpo 07 VH PTN
63	Anticuerpo 07 VH CDR1 PTN	103	Anticuerpo 11 VH CDR1 PTN
64	Anticuerpo 07 VH CDR2 PTN	104	Anticuerpo 11 VH CDR2 PTN
65	Anticuerpo 07 VH CDR3 PTN	105	Anticuerpo 11 VH CDR3 PTN
66	Anticuerpo 07 VL ADN.	106	Anticuerpo 11 VL ADN.

ES 2 399 475 T3

67	Anticuerpo 07 VL PTN	107	Anticuerpo 11 VL PTN
68	Anticuerpo 07 VL CDR1 PTN	108	Anticuerpo 11 VL CDR1 PTN
69	Anticuerpo 07 VL CDR2 PTN	109	Anticuerpo 11 VL CDR2 PTN
70	Anticuerpo 07 VL CDR3 PTN	110	Anticuerpo 11 VL CDR3 PTN
71	Anticuerpo 08 VH ADN.	111	Anticuerpo 12 VH ADN.
72	Anticuerpo 08 VH PTN	112	Anticuerpo 12 VH PTN
73	Anticuerpo 08 VH CDR1 PTN	113	Anticuerpo 12 VH CDR1 PTN
74	Anticuerpo 08 VH CDR2 PTN	114	Anticuerpo 12 VH CDR2 PTN
75	Anticuerpo 08 VH CDR3 PTN	115	Anticuerpo 12 VH CDR3 PTN
76	Anticuerpo 08 VL ADN.	116	Anticuerpo 12 VL ADN.
77	Anticuerpo 08 VL PTN	117	Anticuerpo 12 VL PTN
78	Anticuerpo 08 VL CDR1 PTN	118	Anticuerpo 12 VL CDR1 PTN
79	Anticuerpo 08 VL CDR2 PTN	119	Anticuerpo 12 VL CDR2 PTN
80	Anticuerpo 08 VL CDR3 PTN	120	Anticuerpo 12 VL CDR3 PTN
81	Anticuerpo 09 VH ADN.	121	Anticuerpo 13 VH ADN.
82	Anticuerpo 09 VH PTN	122	Anticuerpo 13 VH PTN
83	Anticuerpo 09 VH CDR1 PTN	123	Anticuerpo 13 VH CDR1 PTN
84	Anticuerpo 09 VH CDR2 PTN	124	Anticuerpo 13 VH CDR2 PTN
85	Anticuerpo 09 VH CDR3 PTN	125	Anticuerpo 13 VH CDR3 PTN
86	Anticuerpo 09 VL ADN.	126	Anticuerpo 13 VL ADN.
87	Anticuerpo 09 VL PTN	127	Anticuerpo 13 VL PTN
88	Anticuerpo 09 VL CDR1 PTN	128	Anticuerpo 13 VL CDR1 PTN
89	Anticuerpo 09 VL CDR2 PTN	129	Anticuerpo 13 VL CDR2 PTN
90	Anticuerpo 09 VL CDR3 PTN	130	Anticuerpo 13 VL CDR3 PTN
91	Anticuerpo 10 VH ADN.	131	Anticuerpo 14 VH ADN.
92	Anticuerpo 10 VH PTN	132	Anticuerpo 14 VH PTN
93	Anticuerpo 10 VH CDR1 PTN	133	Anticuerpo 14 VH CDR1 PTN
94	Anticuerpo 10 VH CDR2 PTN	134	Anticuerpo 14 VH CDR2 PTN
95	Anticuerpo 10 VH CDR3 PTN	135	Anticuerpo 14 VH CDR3 PTN
96	Anticuerpo 10 VL ADN.	136	Anticuerpo 14 VL ADN.
97	Anticuerpo 10 VL PTN	137	Anticuerpo 14 VL PTN
98	Anticuerpo 10 VL CDR1 PTN	138	Anticuerpo 14 VL CDR1 PTN
99	Anticuerpo 10 VL CDR2 PTN	139	Anticuerpo 14 VL CDR2 PTN
100	Anticuerpo 10 VL CDR3 PTN	140	Anticuerpo 14 VL CDR3 PTN
101	Anticuerpo 11 VH ADN.	141	Anticuerpo 15 VH ADN.
102	Anticuerpo 11 VH PTN	142	Anticuerpo 15 VH PTN
143	Anticuerpo 15 VH CDR1 PTN	173	Anticuerpo 6 VL ADN.
144	Anticuerpo 15 VH CDR2 PTN	174	Anticuerpo 6 VL PTN

ES 2 399 475 T3

145	Anticuerpo 15 VH CDR3 PTN	175	Anticuerpo 7 VL ADN.
146	Anticuerpo 15 VL ADN.	176	Anticuerpo 7 VL PTN
147	Anticuerpo 15 VL PTN	177	Anticuerpo 10 VL ADN.
148	Anticuerpo 15 VL CDR1 PTN	178	Anticuerpo 10 VL PTN
149	Anticuerpo 15 VL CDR2 PTN	179	Anticuerpo 11 VL ADN.
150	Anticuerpo 15 VL CDR3 PTN	180	Anticuerpo 11 VL PTN
151	Anticuerpo 16 VH ADN.	181	Anticuerpo 12 y 16 VL ADN.
152	Anticuerpo 16 VH PTN	182	Anticuerpo 12 y 16 VL PTN
153	Anticuerpo 16 VH CDR1 PTN	183	Anticuerpo 13 VL ADN.
154	Anticuerpo 16 VH CDR2 PTN	184	Anticuerpo 13 VL PTN
155	Anticuerpo 16 VH CDR3 PTN	185	Anticuerpo 14 VL ADN.
156	Anticuerpo 16 VL ADN.	186	Anticuerpo 14 VL PTN
157	Anticuerpo 16 VL PTN	187	Anticuerpo 15 VL ADN.
158	Anticuerpo 16 VL CDR1 PTN	188	Anticuerpo 15 VL PTN
159	Anticuerpo 16 VL CDR2 PTN	189	VH FR1 PTN
160	Anticuerpo 16 VL CDR3 PTN	190	VH FR2 PTN
161	Cinamolgo IL-17 ADN.	191	VH FR3 PTN
162	Cinamolgo IL-17 PTN	192	VH FR4 PTN
163	Anticuerpo 1 VL ADN.	193	VL FR1 PTN
164	Anticuerpo 1 VL PTN	194	VL FR2 PTN
165	Anticuerpo 2 VL ADN.	195	VL FR3 PTN
166	Anticuerpo 2 VL PTN	196	VL FR4 PTN
167	Anticuerpo 3 y 9 VL ADN.	197	hIL-17A madura etiquetada
168	Anticuerpo 3 y 9 VL PTN	198	IL-17A madura humana
169	Anticuerpo 4 VL ADN.	199	péptido IL-17A Humano
170	Anticuerpo 4 VL PTN	200	precursor hIL-17A mutante etiquetado
171	Anticuerpo 5 y 8 VL ADN.	17A	
172	Anticuerpo 5 y 8 VL PTN	201	IL-17A humana mutante madura
<p>Anticuerpos 3, 4 y 5 tienen el mismo dominio VH. Anticuerpos 9, 10 y 12 tienen el mismo dominio VH. Anticuerpos 2 y 10 tienen las mismas VL CDRs. La secuencia del dominio VL mostrada para el Anticuerpo 2 es de la línea germinal y la secuencia del dominio VL mostrada para el Anticuerpo 10 no es de la línea germinal. Anticuerpos 3, 9 y 11 tienen el mismo dominio VL. Anticuerpos 4 y 15 tienen el mismo dominio VL. Anticuerpos 5 y 8 tienen el mismo dominio VL. Anticuerpos 12 y 16 tienen el mismo dominio VL.</p>			

5 Las secuencias de nucleótido del dominio VL de los anticuerpos 1 a 16 no incluyen el codón gag mostrado en el extremo 3' en las sec. con núms. de ident.: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146 y 156. En correspondencia, las secuencias de aminoácido del dominio VL no incluyen el residuo Glu C-terminal (residuo 112) en las sec. con núms. de ident.: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147 y 157, respectivamente. El residuo Glu112 y el codón

gag correspondiente no se expresan en los Anticuerpos 1 a 16. Una comparación de las secuencias escritas con los segmentos de genes de línea germinal indica que el residuo Glu y el codón gag correspondiente no forman parte del dominio VL.

- 5 El residuo Gly en la posición 111 (residuo Kabat 108) estaba presente en las secuencias de scFv e IgG expresadas. Sin embargo, este residuo no está presente en las secuencias del segmento j de la línea germinal humana que forma la región del marco 4 del dominio VL. El residuo Gly no se considera una parte del dominio VL.

- 10 Para expresar la cadena ligera de la IgG, se proporcionó una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera del anticuerpo, que comprende un primer exón que codifica el dominio VL, un segundo exón que codifica el dominio CL, y un intrón que separa el primer exón y el segundo exón. En circunstancias normales, el intrón se empalma por la maquinaria celular de procesamiento de ARNm, que une el extremo 3' del primer exón al extremo 5' del segundo exón. Así, cuando el ADN que tiene dicha secuencia de nucleótidos se expresa como ARN, los exones primero y segundo se empalman juntos. La traducción de los ARN empalmados produce un polipéptido que comprende el dominio VL y el CL. Después del empalme, la Gly en la posición 111 está codificada por la última base (g) de la secuencia del marco 4 del dominio VL y las primeras dos bases (gt) del dominio CL.

- 15 Las secuencias de los dominios VL de los Anticuerpos 1 a 16 son las sec. con núms. de ident.: 163 a 188 como se indicó anteriormente. Las secuencias de nucleótido del dominio terminan con cta como codón final y la Leu es el residuo de aminoácido final en las correspondientes secuencias de aminoácidos del dominio VL.
- 20

Referencias

- 25 Todas las referencias citadas en cualquier parte en esta descripción, incluyendo las citadas en cualquier parte anteriormente, se incorporan en la presente como referencia en su totalidad para todos los propósitos.
- Al-Lazikani y otros, *Journal Molecular Biology* 273(4):927-948, 1997
 Altschul y otros (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 405-410
 Amit y otros, *Science*, 233:747-753, 1986
 Andersen, DC. & Krummen, L. *Current Opinion in Biotechnology* 13:117, 2002
- 30 Antonysamy, MA. y otros, *J Immunol.* 162(1):577-84, 1999
 Ausubel y otros eds., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 4ta edición 1999
 Bagshawe, K.D. y otros. *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4:915-922, 1991
 Bannister, D y otros. *Biotechnol bioeng* 94(5): 931-937, 2006
- 35 Barbas y otros. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 91:3809-3813, 1994
 Betteli, E. y otros. *Nature* 441 (7090), 166-168, (2006)
 Bird y otros. *Science*, 242, 423-426, 1988
 Burchill, MA. y otros. *Infect Immun.* 71(6):3437-42, 2003
 Bush, K. y otros. *Arthritis Rheum.* 46:802-805, 2002
- 40 Cai, L. y otros. *Cytokine* 16(1) 10-21, 2001
 Caton y otros. *J. Immunol.*, 144:1965-1968, 1990
 CCP4 (Proyecto Computacional de Colaboración Número 4) (1994) *The CCP4 suite: programs for protein crystallography.* *Acta Crystallogr D* 50: 760-763
- 45 Chabaud, M. y otros *J. Immunol.* 161, 409-414, 1998
 Chabaud, M. y otros *Arthritis Rheum.* 42, 963-970, 1999
 Chabaud, M. and Miossec, P. *Arthritis Rheum.* 44(6) 1293-1303, 2001
 Chadd, HE. and Chamow, SM. *Current Opinion in Biotechnology* 12:188-194, 2001
 Cho, ML. y otros *Arthritis Rheum.* 50(3), 776-784, 2004
- 50 Choithia y otros *Science*, 223:755-758, 1986
 Choithia y otros. *J. Mol. Biol.*, 196:901-917, 1987
 Choithia y otros. *Nature*, 342:877-883, 1989
 Choithia, C. y otros. *Journal Molecular Biology* 1992227, 799-817, 1992
 Chung, DR. y otros. *J Exp Med.* 195(11):1471-8, 2002
 Clackson, T. and Lowman, H.B. *Phage Display - A Practical Approach*, 2004. Oxford University Press
- 55 Csiszar, A. *FASEB J.*;17(9):1183-5, 2003
 Csiszar, A. and Ungvari, Z. *Med Hypotheses*, 63(4):696-8, 2004
 Denison DGT. (Editor), Holmes, CC. y otros, *Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression (Wiley Series in Probability and Statistics)*. John Wiley & Sons; (July 2002), ISBN: 0471490369
 Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) *Coot: model-building tools for molecular graphics Acta Crystallogr D*60: 2126-2132
- 60 Englander, S.W. y otros. *Methods Enzymol.* 232:26-42, 1994

- Faber y otros, *Immunotechnology* 3, 253-270, 1998
- Faour, WH. y otros. *J.Biol. Chem.* 278(29):26897-26907, 2003
- Ferretti, S. y otros. *J. Immunol.* 170:2106-2112, 2003
- 5 Fisman, EZ. *Cardiovasc Diabetol.* 12:2:11, 2003
- Footo & Winter *J Mol Biol.* 1992 Mar 20;224(2):487-99
- Fort, M. y otros. *Immunity*, 15:985-995, 2001
- Fujino, S. y otros. *Gut* 52:65-70, 2003
- Ghose, AK. & Viswanadhan, VN. *Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery.* ISBN: 0-8247-0487-8
- 10 Glennie, M J. y otros, 1987 *J. Immunol.* 139, 2367-2375
- Gram y otros, 1992, *Proc. Natl Acad. Sci., Estados Unidos*, 89:3576-3580
- Guex, N. y Peitsch, M.C. *Electrophoresis* (1997) 18, 2714-2723 Haan & Maggos (2004) *BioCentury*, 12(5): A1-A6
- Hamzaoui, K. y otros. *Scand J Rheumatol.* 31(4):205-10, 2002
- 15 Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., págs. 726, 1988
- Haudenschild, D. y otros. *J Biol Chem.*, 277:4309-16, 2002
- Haudenschild, D. y otros. *Prostate*, ahead of print, 2006
- Haznedaroglu, S. y otros. *Clin Exp Rheumatol.* 23(4 Suppl 38):S77-80, 2005
- 20 Hellings, PW. y otros. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 28(1):42-50, 2003
- Holliger, P. y otros, *PNAS USA* 90:6444-6448, 1993a
- Holliger, P. & Winter, G. 1999 *Cancer and metastasis rev.* 18:411-419, 1999
- Holt y otros. *Trends in Biotechnology* 21, 484-490, 2003
- Honorati, MC. y otros. *Osteoarthritis & Cartilage* 10:799-807, 2002
- 25 Hsieh, HG. y otros. *Transpl. Int.* 14:287-298, 2001
- Hu, S. y otros, *Cancer Res.*, 56, 3055-3061, 1996
- Hunter WM. and Greenwood FC. *Nature*, 194:495, 1962
- Hurst, SD. y otros. *J Immunol*, 169:443-453, 2002
- Huston . *PNAS USA*, 85, 5879-5883, 1988
- 30 Hutchings, C. *Generation of Naive Human Antibody Libraries*, in *Antibody Engineering*, R. Kontermann and S. Dubel, Editors. 2001, Springer Laboratory Manuals, Berlin. p. 93
- Hymowitz, SG. y otros. *EMBO J*, 50:53321-5341, 2001
- Kabat, EA. y otros. *Sequences of Proteins of Immunological Interest.* 4ta Edición. Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, 1987
- 35 Kabat, EA. I. (1991a) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Edición. Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Servicio Público, NIH, Washington
- Kabat y otros, *J. Immunol.*, 147:1709-1719, 1991 (b)
- Kandel, Abraham & Backer, Eric. *Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis.* Prentice Hall PTR, (May 11, 1995), ISBN: 0133418847
- 40 Karpusas y otros, *Structure* 9, 321, 2001
- Katz, Y. y otros *Arthritis Rheum.* 44(9):2176-2184, 2001
- Kay, BK., Winter, J., and McCafferty, J. *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, San Diego: Academic Press, 1996
- Knappik y otros *J. Mol. Biol.* 296, 57-86, 2000
- 45 Koenders, MI. y otros *Am J Pathol.* 167(1):141-9, 2005 (a)
- Koenders, MI. y otros. *Arthritis Rheum.* 52(3):975-983, 2005 (b)
- Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975
- Koide y otros. *Journal of Molecular Biology*, 284:1141-1151, 1998
- Kontermann, R & Dubel, S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag Nueva York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545.
- Kotake, S. y otros. *J.Clin. Invest.* 103:1345-1352, 1999
- 50 Kramer, G. and Marberger, M. *Curr Opin Urol.* enero;16(1) :25-9, 2006
- Krebs y otros. *Journal of Immunological Methods*, 254:67-84, 2001
- Krzanowski, W. *Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)).* Oxford University Press; (diciembre 2000), ISBN: 0198507089
- 55 Kuestner R. y otros. Abstract 206, *Keystone Symposia 'Cytokine, Disease and Therapeutic Intervention'*, 2005
- Kurasawa, K. y otros. *Arthritis Rheum*, 43(11):2455-63, 2000
- Larrick, JW. and Thomas, DW. *Current Opinion in Biotechnology* 12:411-418, 2001
- Le Grand, A. y otros. *Arthritis Rheum.* 44(9):2078-2083, 2001
- Ledermann JA. y otros. *Int. J. Cancer* 47:659-664, 1991
- Lee, J. y otros. *J Biol Chem.* 276:1660-1664, 2001

- Leslie A. (1991) Macromolecular data processing. In Moras,D., Podjarny, A.D. and Thierry, J.C. (eds), Crystallographic Computing V. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, págs. 27-38
- Li, H. y otros. Proc. Natl Acad Sci., USA, 97:773-778, 2000
- Linden, A. Pulm Pharmacol Ther., 19(1):47-50, 2006
- 5 Lock, C. y otros. Nat. Med. 8:500-508, 2002
- Lubberts, E. y otros. Arthritis Rheum. 43:1300-1306, 2000
- Lubberts, E. y otros. J. Immunol. 167(2):1004-1013, 2001
- Lubberts, E. y otros. J. Immunol. 170(5):2655-6, 2003
- Lubberts, E. y otros. Arthritis Rheum. 50(2):650-659, 2004
- 10 Mach y otros. Anal. Biochem 200(1): 20-26, 1992
- Maertzdorf, J. y otros. J Immunol, 169(10):5897-903, 2002
- Maggio, E. y otros. Ann Oncol., 13 Suppl 1:52-6, 2002
- Malemud, C.J. y otros. Biodrugs 18(1):23-35, 2004
- Marks y otros. Bio/Technology, 10:779-783, 1992
- 15 Matthews, J.Mol.Biol 33, 491-497 (1968)
- McCafferty y otros. Nature, 348:552-554, 1990
- Mendez, M. y otros. Nature Genet, 15(2):146-156, 1997
- Merchand y otros. Nature Biotech., 16:677-681, 1998
- Molet, S.M. y otros. J. Allergy Clin. Immunol 108:430-438, 2001
- 20 Moore, EE. y otros. Neuromusc Disord., 12:141-150, 2002
- Moseley, TA. y otros. Cyto Growth Factor Rev., 14:155-174, 2003
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) Acta Crystallogr D53: 240-255
- Nakae, S. y otros. J. Immunol. 171(11):6173-6177, 2003
- Nielsen, OH. y otros. Scand J Gastroenterol, 38(2):180-5, 2003
- 25 Norman y otros, Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3ra edición (Abril 1998) ISBN: 0471170828
- Numasaki, M. y otros. J Immunol., 175(9):6177-89, 2005
- Nygren y otros. Current Opinion in Structural Biology, 7:463-469, 1997
- Oda, N. y otros. Am J Respir Crit Care Med., 171(1):12-8, 2005
- Osourn, JK. y otros. Immunotechnology, 2(3):181-96, 1996
- 30 Padavattan y otros., J.Mol.Biol 368, 742, 2007
- Pantazatos, D. y otros. Proc. Natl Acad Sci., 101(3):751-756, 2004
- Pearson y Lipman(1988) PNAS USA 85: 2444-2448
- Persic, L. y otros. Gene. 187(1):9-18, 1997
- Plückthun, A. Bio/Technology 9:545-551, 1991
- 35 Reiter, Y. y otros, Nature Biotech, 14:1239-1245, 1996
- Repp, R. y otros, J. Hemat. 377-382, 1995
- Ridgeway, JBB. y otros, Protein Eng., 9:616-621, 1996
- Robinson, JR. ed., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978
- Ruddy, M.J. y otros. J.Biol. Chem 279(4):2559-2567, 2004
- 40 Rudolf, R. y otros. FASEB J. 10, 49-56, 1996
- Sambrook y Russell, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3ra edición, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schier y otros, J. Mol. Biol. 263:551-567, 1996
- Segal y otros. PNAS, 71:4298-4302, 1974
- Sharon y otros. PNAS, 87:4814-4817, 1990 (a)
- 45 Sharon y otros. J. Immunol., 144:4863-4869, 1990 (b)
- Shen, F. y otros. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 27(10):654-8 2004(a)
- Shen, F. y otros. Zhonghua Nei Ke Za Zhi, 43(12):888-90, 2004 (b)
- Shi, Y. y otros. J. Biol Chem, 275:19167-19176, 2000
- Smith and Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197
- 50 Sohn, MH. y otros. Scand J Rheumatol. 32(6):346-6, 2003
- Staerz U. D. and Bevan M. J. PNAS 83, 1986
- Stamp, L.K. y otros. J.Rheumatol. 31(7):1296-1254, 2004
- Starnes, T. y otros. J. Immunol, 169:642-646, 2002
- Stemmer, Nature, 370:389-391, 1994
- 55 Suresh MR. y otros, Method Enzymol. 121:210-228, 1986
- Sylvester, J. y otros. Cell Signal 16(4):469-476, 2004
- Takahashi, K. J Clin Periodontol. 32(4):369-74, 2005
- Tang, JL. y otros. Transplantation, 72(2):348-50, 2001
- Teunissen, M.B.M. y otros. J. Invest. Dermatol. 111:645-649, 1998
- 60 Thompson, J. y otros. J Mol Biol. 256(1):77-88, 1996

Toda, M. y otros. J Allergy Clin Immunol. 111(4) :875-81, 2003
 Tomlinson, I., VBASE. MRC Centre of Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido, 1997
 Touil, T. y otros. Drug News Perspect., 19(2):77-83, 2006
 Toy, D., y otros. Journal of Immunology., 177(1):36-39, 2006
 5 Vanaudenaerde, BM. y otros. J Heart Lung Transplant. 22(11):1280-3, 2003
 Van Bezooijen, RL. y otros. J Bone Miner Res. 14(9):1513-21, 1999
 Vaughan, TJ. y otros. Nature Biotechnology 14(3):309-14, 1996
 Vernal, R. y otros. J Clin Periodontol. 32(4):383-9, 2005
 Voet & Voet, Biochemistry, 2da Edición, (Wiley) 1995
 10 Ward, ES. y otros. Nature 341:544-546, 1989
 Wess, L. En: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7, 2004
 Whitelegg, NRU. and Rees, AR. Prot. Eng., 12:815-824, 2000
 Witten, Ian H. & Frank, Eibe. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations.
 Morgan Kaufmann; (October 11, 1999), ISBN: 1558605525
 15 Wold, y otros, Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics - Mathematics and Statistics in Chemistry (Ed.: B.
 Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984 (ISBN 90-277-1846-6)
 Wong, CK. y otros. Lupus, 9(8):589-93, 2000
 Wong, CK. y otros. Clin Exp Immunol. 125(2):177-83, 2001
 Yen, D. y otros. J Clin Invest. 116(5):1310-6, 2006
 20 Yoshida, S. y otros. Am J Transplant. 6(4):724-35, 2006
 Zhang, Z. y otros. Inflamm Bowel Dis. 12(5):382-8, 2006

Listado de Secuencia

25	<110> AstraZeneca AB Cambridge Antibody Technology Limited Cochrane, Duncan James Dufner, Patrick Nicholas Langham, Caroline Jane	
30	Needham, Maurice Ronald Charles Russell, Caroline Susan Sleeman, Matthew Alexander Welsh, Fraser Ewing	
35	<120> Compuestos <130> 102331 <140> <141> <150> US 60/815,828 <151> 2006-06-23	
40	<150> US 60/913,566 <151> 2007-04-24 <160> 201 <170> PatentIn versión 3.3 <210> 1	
45	<211> 354 <212> ADN <213> Homo sapiens <220> <223> Anticuerpo 01	
50	<400> 1 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120 ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagatcta 300 at ttgggggag tggctgggag ctggggccag gggacaatgg tcaccgtctc ctca 354	

<210> 2
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <220>
 <223> Anticuerpo 01
 <400> 2
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Leu Ile Trp Gly Val Ala Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Met Val Thr Val Ser Ser
 115
 10 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 15 <223> Anticuerpo 01
 <400> 3
 Ser Tyr Ala Met Ser
 5
 <210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 01
 <400> 4
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 5 10 15
 Gly
 25 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 30 <223> Anticuerpo 01
 <400> 5
 Asp Leu Ile Trp Gly Val Ala Gly Ser
 5
 <210> 6
 <211> 336

ES 2 399 475 T3

<400> 21
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tctctgtcag cctctggatt caccttttagc agctatgcca tgagctgggt cegccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcgactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagatcta 300
 attcacgggg tgacgcggaa ctggggccag gggacactgg tcaccgtctc ctca 354
 <210> 22
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 03
 <400> 22
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Leu Ile His Gly Val Thr Arg Asn Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 03
 <400> 23
 Ser Tyr Ala Met Ser
 5
 <210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 03
 <400> 24
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 5 10 15
 Gly
 <210> 25
 <211> 9

<400> 37
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
 35 40 45
 Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ser Pro
 85 90 95
 Thr Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Glu
 100 105 110

<210> 38
 <211> 13
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 04
 <400> 38
 10 Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr Tyr Val Gln
 5 10
 <210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 04
 <400> 39
 Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 5
 <210> 40
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 04
 25 <400> 40
 Gln Ser Tyr Ser Pro Thr Ser Val Val
 5
 <210> 41
 <211> 354
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 05

ES 2 399 475 T3

<400> 41
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagacte 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagatcta 300
attcacgggg tgacgcggaa ctggggccag gggacactgg tcaccgtctc ctca 354
<210> 42
<211> 118
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 05
<400> 42
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Ile His Gly Val Thr Arg Asn Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
10 Leu Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 43
<211> 5
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 05
<400> 43
Ser Tyr Ala Met Ser
5
20 <210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
25 <223> Anticuerpo 05
<400> 44
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
5 10 15
Gly
30 <210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
 35 40 45
 Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ser Pro
 85 90 95
 Ser Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Glu
 100 105 110

- <210> 58
- <211> 13
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <223> Anticuerpo 06
- <400> 58
- 10 Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr Tyr Val Gln
 5 10
- <210> 59
- <211> 7
- <212> PRT
- 15 <213> Homo sapiens
- <220>
- <223> Anticuerpo 06
- <400> 59
- 20 Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 5
- <210> 60
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 25 <223> Anticuerpo 06
- <400> 60
- Gln Ser Tyr Ser Pro Ser Ser Val Val
 5
- <210> 61
- <211> 354
- <212> ADN
- 30 <213> Homo sapiens
- <220>
- <223> Anticuerpo 07

ES 2 399 475 T3

```

<400> 77
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
      5              10              15

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

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
      35              40              45

Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
      50              55              60

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

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asn His
      85              90              95

Lys Asp Ile Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Glu

100              105              110
5 <210> 78
  <211> 13
  <212> PRT
  <213> Homo sapiens
  <220>
10 <223> Anticuerpo 08
  <400> 78
  Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr Tyr Val Gln
      5              10

  <210> 79
  <211> 7
15 <212> PRT
  <213> Homo sapiens
  <220>
  <223> Anticuerpo 08
  <400> 79
  Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser
      5

20 <210> 80
  <211> 9
  <212> PRT
  <213> Homo sapiens
25 <220>
  <223> Anticuerpo 08
  <400> 80
  Gln Ser Tyr Asn His Lys Asp Ile Val
      5

30 <210> 81
  <211> 354
  <212> ADN
  <213> Homo sapiens
  <220>
  <223> Anticuerpo 09
35 <400> 81
  gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
  tctctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
  ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

```

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagatcta 300
atcttcgggg tggggggggg gtggggccag gggacaatgg tcaccgtctc ctca 354
<210> 82
5 <211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 09
<400> 82
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Ile Phe Gly Val Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
10 Met Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 83
<211> 5
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 09
<400> 83
Ser Tyr Ala Met Ser
5
20 <210> 84
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
25 <223> Anticuerpo 09
<400> 84
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
5 10 15
Gly
30 <210> 85
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 09

<400> 85
Asp Leu Ile Phe Gly Val Gly Gly Gly
 5

<210> 86
 <211> 336
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 09
 <400> 86
aattttatgc tgactcagcc cactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
tcctgcaccc gcagcagtg cagccttgcc aactactatg tgcagtgga ccaacagcgc 120
cggggcagtg cccccacat tgtgatcttt gcgaataacc aaagaccctc tggggtcctc 180
gatcgattct ctggctccat cgacagetcc tccaactctg cctccctcac catctctaga 240
ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgccagtcct actcccccca cagcgtggtg 300
 10 **ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtgag** 336
 <210> 87
 <211> 112
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 09
 <400> 87
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr
 20 25 30
Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
 35 40 45
Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80
Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ser Pro
 85 90 95
 20 **His Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Glu**
 100 105 110
 <210> 88
 <211> 13
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 09
 <400> 88
Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr Tyr Val Gln
 5 10
 <210> 89
 30 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 09


```

<220>
<223> Anticuerpo 10
<400> 93
Ser Tyr Ala Met Ser
      5
5  <210> 94
    <211> 17
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <220>
10 <223> Anticuerpo 10
    <400> 94
    Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
      5              10              15

    Gly
    <210> 95
    <211> 9
15 <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <220>
    <223> Anticuerpo 10
    <400> 95
20 Asp Leu Ile Phe Gly Val Gly Gly Gly
      5

    <210> 96
    <211> 336
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens
25 <220>
    <223> Anticuerpo 10
    <400> 96
aattttatgc tgactcagcc cactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc      60
tcctgcaccc gcagcagtg cagccttgcc aactactatg tgcagtggta ccaacagcgc      120
ccgggcagtg cccccacat tgtgatcttt gcgaataacc aaagaccctc tggggtcctc      180
gatcgattct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctaga      240
ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgccagtcgt acgaccccca cagcgtggtg      300
30 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtgag      336
    <210> 97
    <211> 112
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens
35 <220>
    <223> Anticuerpo 10

```


ES 2 399 475 T3

<400> 101
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccagget 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagatcta 300
at ttgggggag tggctgggag ctggggccag gggacaatgg tcaccgtctc ctca 354
<210> 102
<211> 118
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 11
<400> 102
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
10 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Leu Ile Trp Gly Val Ala Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Met Val Thr Val Ser Ser
115
15 <210> 103
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 11
20 <400> 103
Ser Tyr Ala Met Ser
5
25 <210> 104
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 11
<400> 104
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
5 10 15
Gly

<400> 116
aattttatgc tgactcagcc cactctgtg tgggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
tcctgcaccc gcagcagtgg cagccttgcc aactactatg tgcagtggta ccaacagcgc 120
ccgggcagtg cccccacat tgtgatcttt gcgaataacc aaagaccctc tggggtcctt 180
gatcgattct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctaga 240
ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgccagacgt acgacccta cagcgtggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtgag 336
<210> 117
<211> 112
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 12
<400> 117
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr
20 25 30
Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
35 40 45
10 Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80
Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Asp Pro
85 90 95
Tyr Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Glu
100 105 110
15 <210> 118
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 12
20 <400> 118
Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr Tyr Val Gln
5 10
<210> 119
<211> 7
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 12
<400> 119
Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser
5
30 <210> 120
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 12

<400> 120
Gln Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Val Val
 5

<210> 121
 <211> 354
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 13
 <400> 121
gagggtgcagc tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagatcta 300

10 **atttggggag tggctgggag ctggggccag gggacactgg tcaccgtctc ctca** 354
 <210> 122
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <220>
 <223> Anticuerpo 13
 <400> 122
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Arg Asp Leu Ile Trp Gly Val Ala Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

20 <210> 123
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 13
 25 <400> 123
Ser Tyr Ala Met Ser
 5

<210> 124
 <211> 17
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 13
 5 <400> 128
 Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr Tyr Val Gln
 5 10
 <210> 129
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 13
 <400> 129
 Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 5
 15 <210> 130
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 20 <223> Anticuerpo 13
 <400> 130
 Gln Ser Tyr Asp Pro Arg Val Val Val
 5
 <210> 131
 <211> 354
 25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 14
 <400> 131
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcgactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagatcta 300
 30 atttggggag tggctgggag ctggggccag gggacactgg tcaccgtctc ctca 354
 <210> 132
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <220>
 <223> Anticuerpo 14

<400> 132
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Leu Ile Trp Gly Val Ala Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 133
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

10 <223> Anticuerpo 14
 <400> 133
 Ser Tyr Ala Met Ser
 5
 <210> 134
 <211> 17

15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 14
 <400> 134
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 5 10 15

20 Gly
 <210> 135
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <223> Anticuerpo 14
 <400> 135
 Asp Leu Ile Trp Gly Val Ala Gly Ser
 5
 <210> 136
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 14

30

ES 2 399 475 T3

<400> 136
aattttatgc tgactcagcc ccaactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
tctctgacccc gcagcagtgg cagccttgcc aactactatg tgcagtggta ccaacagcgc 120
ccgggcagtg cccccacat tgtgatcttt gcgaataacc aaagaccctc tggggtcctc 180
gatcgattct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctaga 240
ctgaagactg aggacgaggg tgactactac tgccagtctt atgacccgac gaaccaggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtgag 336
<210> 137
<211> 112
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 14
<400> 137
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr
20 25 30
Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
35 40 45
Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80
Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Pro
85 90 95
10 Thr Asn Gln Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Glu
100 105 110
<210> 138
<211> 13
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 14
<400> 138
Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr Tyr Val Gln
5 10
20 <210> 139
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
25 <223> Anticuerpo 14
<400> 139
Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser
5
30 <210> 140
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 14

<210> 148
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <220>
 <223> Anticuerpo 15
 <400> 148
Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr Tyr Val Gln
 5 10
 <210> 149
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 15
 15 <400> 149
Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 5
 <210> 150
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 15
 <400> 150
Gln Ser Tyr Ser Pro Thr Ser Val Val
 5
 25 <210> 151
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 30 <223> Anticuerpo 16
 <400> 151
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt cgcaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagatcta 300
at ttggggag tggctgggag ctggggccag gggacaatgg tcaccgtctc ctca 354
 35 <210> 152
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 40 <223> Anticuerpo 16

<400> 152
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Leu Ile Trp Gly Val Ala Gly Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Met Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 153
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 16
 10 <400> 153
 Ser Tyr Ala Met Ser
 5
 <210> 154
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <220>
 <223> Anticuerpo 16
 <400> 154
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 5 10 15
 Gly
 20 <210> 155
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 16
 25 <400> 155
 Asp Leu Ile Trp Gly Val Ala Gly Ser
 5
 <210> 156
 <211> 336
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 16

ES 2 399 475 T3

<400> 156
aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tccgagctctc cggggaagac ggtaaccatc 60
tctctgacccc gcagcagtg gacgcttgcc aactactatg tgcagtggtta ccaacagcgc 120
ccgggacagtg cccccacat tgtgatcttt gcgaataacc aaagaccctc tggggtcctc 180
gatcgattct ctggetccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctaga 240
ctgaagactg aggacgagc tgactactac tgccagacgt acgacccta cagcgtggtg 300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtgag 336
<210> 157
<211> 112
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 16
<400> 157
10 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
5 10 15
Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr
20 25 30
Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
35 40 45
Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80
Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Asp Pro
85 90 95
Tyr Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Glu
100 105 110
<210> 158
15 <211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 16
20 <400> 158
Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr Tyr Val Gln
5 10
<210> 159
<211> 7
25 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 16
<400> 159
Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser
5
30 <210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 16

<400> 160

Gln Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Val Val
5

<210> 161

<211> 466

<212> ADN

<213> Macaca fascicularis

<400> 161

atgactcctg ggaagacctc attggtgcta ctgctgctgc tgctgagcct ggaggccata 60
gtgaaggcag gaatagcaat cccacgaaat tcaggatgcc caaattccga ggacaagaac 120
ttccccgga ctgtgatggt caacctgaac atccataacc ggaataccag taccaatccc 180
aaaaggtcct cagattacta caaccgatcc acctcacctt ggaatctcca ccgcaatgag 240
gacctgaga gatatccctc tgtgatctgg gaggcaaaat gccgccactt aggctgcgtc 300
aaggctgatg ggaacgtaga ctaccacatg aactctgtcc ccatccagca agagatcctg 360
gtcctgcgca gggagcctcg gcaactgcccc aactccttcc ggctggagaa gatactggtg 420
tccgtgggct gcacctgtgt cccccccatt gtccaccatg tagcct 466

<210> 162

<211> 155

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 162

Met Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Leu Leu Leu Leu Leu Ser
1 5 10 15
Leu Glu Ala Ile Val Lys Ala Gly Ile Ala Ile Pro Arg Asn Ser Gly
20 25 30
Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn
35 40 45
Leu Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Ser Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser
50 55 60
Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu
65 70 75 80
Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His
85 90 95
Leu Gly Cys Val Lys Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser
100 105 110
Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Arg His
115 120 125
Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys
130 135 140
Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
145 150 155

<210> 163

<211> 330

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Anticuerpo 01

<400> 163
 aattttatgc tgactcagcc cactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
 tcctgcaccc gcagcagtg cagccttgcc aactactatg tcgagtggta ccaacagcgc 120
 ccgggcagtg cccccacat tgtgatcttt gcgaataacc aaagaccctc tggggtccct 180
 gatcgattct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctaga 240
 ctgaagactg aggacgagc tgactactac tgccagtctt atgatgacag cagcgtggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
 <210> 164
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 01
 <400> 164
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
 35 40 45
 Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Asp
 85 90 95
 Ser Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 <210> 165
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 02
 <400> 165
 aattttatgc tgactcagcc cactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
 tcctgcaccc gcagcagtg cagccttgcc aactactatg tcgagtggta ccaacagcgc 120
 ccgggcagtt cccccacat tgtgatcttt gcgaataacc aaagaccctc tggggtccct 180
 gatcgattct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga 240
 ctgaagactg aggacgagc tgactactac tgccagtctt acgaccccca cagcgtggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
 <210> 166
 <211> 110

ES 2 399 475 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 02
 5 <400> 166
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Ile Val
 35 40 45
 Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 65 70 75 80
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Pro
 85 90 95
 His Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 <210> 167
 10 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 15 <223> Anticuerpo 03
 <400> 167
 aat t t t t a t g c t g a c t c a g c c c a c t c t g t g t c g g a g t c t c c g g g g a a g a c g g t a a c c a t c 60
 t c c t g c a c c c g c a g c a g t g g c a g c c t t g c c a a c t a c t a t g t g c a g t g g t a c c a c a g c g c 120
 c c g g g c a g t g c c c c c a c c a t t g t g a t c t t t g c g a a t a a c c a a g a c c c t c t g g g g t c c c t 180
 g a t c g a t t c t c t g g c t c c a t c g a c a g c t c c t c c a a c t c t g c c t c c c t c a c c a t c t c t a g a 240
 c t g a a g a c t g a g g a c g a g g c t g a c t a c t a c t g c c a g t c c t a c t c c c c c c a c a g c g t g g t g 300
 t t c g g c g g a g g g a c c a a g c t g a c c g t c c t a 330
 <210> 168
 <211> 110
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 03

<400> 168
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
 35 40 45
 Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ser Pro
 85 90 95
 His Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

5 <210> 169
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 10 <223> Anticuerpo 04
 <400> 169
 aatatttatgc tgactcagcc ccaactctgtg tcggagtcctc cggggaagac ggtaaccatc 60
 tcctgcaccc gcagcagtg ggcagccttgcc aactactatg tgcagtggtta ccaacagcgc 120
 ccgggcagtg cccccacat tgtgatcttt gcgaataacc aaagaccctc tggggtcct 180
 gatcgattct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctaga 240
 ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgccagtcct actccccgac gagcgtggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
 <210> 170
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 04

ES 2 399 475 T3

<400> 170

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15

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

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
 35 40 45

Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ser Pro
 85 90 95

Thr Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

- 5 <210> 171
- <211> 330
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 10 <223> Anticuerpo 05

<400> 171
 aattttatgc tgactcagcc ccaactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccate 60
 tcctgcaccc gcagcagtgg cagccttgcc aactactatg tgcagtggta ccaacagcgc 120
 ccgggcagtg cccccacat tgtgatcttt gcgaaataacc aaagaccctc tggggtcctt 180
 gatcgattct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctetaga 240
 ctgaagactg aggacgaggg tgactactac tgccagtctt ataaccacaa ggacategtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

- 15 <210> 172
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <223> Anticuerpo 05

ES 2 399 475 T3

<400> 172

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15

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

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
 35 40 45

Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asn His
 85 90 95

Lys Asp Ile Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

- 5 <210> 173
- <211> 330
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 10 <223> Anticuerpo 06

<400> 173
 aatthttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
 tctctgcaacc gcagcagtg cagccttgcc aactactatg tgcagtggta ccaacagcgc 120
 ccgggcagtg cccccacat tgtgatcttt gcaataacc aaagaccctc tggggtcct 180
 gatcgattct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctetaga 240
 ctgaagactg aggaacgaggc tgactactac tgccagtcgt acagcccagag cagcgtggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

- 15 <210> 174
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <223> Anticuerpo 06

ES 2 399 475 T3

<400> 174
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
 35 40 45
 Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ser Pro
 85 90 95
 Ser Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

5 <210> 175
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 10 <223> Anticuerpo 07
 <400> 175
 aatatttatgc tgactcagcc ccaactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
 tcctgcaccc gcagcagtg cagccttgcc aactactatg tgcagtggta ccaacagcgc 120
 ccgggcagtt cccccacat tgtgatcttt gegaataacc aaagaccctc tggggtcctt 180
 gatcgattct etggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctgga 240
 ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgccagacgt acgacccta cagcgtggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
 <210> 176
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 07

ES 2 399 475 T3

<400> 176
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Ile Val
 35 40 45
 Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 65 70 75 80
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Asp Pro
 85 90 95
 Tyr Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

5 <210> 177
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 10 <223> Anticuerpo 10
 <400> 177
 aatattatgc tgactcagcc ccaactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
 tcctgcaccc gcagcagtg cagccttgcc aactactatg tgcagtggtta ccaacagcgc 120
 ccgggcagtg cccccacat tgtgatcttt gegaataacc aaagaccctc tggggtcctt 180
 gatcgattct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctaga 240
 ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgccagtcgt acgaccccca cagcgtggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
 <210> 178
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 10
 15

ES 2 399 475 T3

<400> 178

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15

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

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
 35 40 45

Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Pro
 85 90 95

His Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

- 5 <210> 179
- <211> 330
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 10 <223> Anticuerpo 11

<400> 179
 aatatttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
 tcctgcaccc gcagcagtgg cagccttgcc aactactatg tgcagtggta ccaacagcgc 120
 ccgggcagtg cccccacat tgtgatcttt gcgaataacc aaagaccctc tggggteccct 180
 gatcgattct ctggctecat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctetaga 240
 ctgaagactg aggacgagge tgactactac tgccagtcct actccccca cagcgtggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

- <210> 180
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 15 <223> Anticuerpo 11

ES 2 399 475 T3

<400> 180

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15

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

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
 35 40 45

Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ser Pro
 85 90 95

His Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

- 5 <210> 181
- <211> 330
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 10 <223> Anticuerpo 12

<400> 181
 aatthttatgc tgactcagcc ccaactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
 tcctgcaccc gcagcagtg cagccttgcc aactactatg tgcagtggtta ccaacagcgc 120
 ccgggcagtg cccccacat tgtgatcttt gcgaataacc aaagaccctc tggggtcctt 180
 gatcgattot ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctetaga 240
 ctgaagactg aggacgaggc tgactactac tgccagacgt acgacccta cagcgtggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330

- 15 <210> 182
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <223> Anticuerpo 12

ES 2 399 475 T3

<400> 182

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15

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

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
 35 40 45

Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Asp Pro
 85 90 95

Tyr Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

- 5 <210> 183
- <211> 330
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 10 <223> Anticuerpo 13

<400> 183
 aat t t t t a t g c t g a c t c a g c c c c a c t c t g t g t c g g a g t c t c c g g g g a a g a c g g t a a c c a t c 60
 t c c t g c a c c c g c a g c a g t g g c a g c o t t g c c a a c t a c t a t g t g c a g t g g t a c c a a c a g c g c 120
 c c g g g c a g t g c c c c c a c c a t t g t g a t c t t t g c g a a t a a c c a a g a c c c t c t g g g g t c c e t 180
 g a t c g a t t c t c t g g c t c c a t c g a c a g c t c c t c c a a c t c t g c o t c c e t c a c c a t c t c t a g a 240
 c t g a a g a c t g a g g a c g a g g c t g a c t a c t a c t g c c a g t c t t a t g a c c c g c g g t g g t c g t g 300
 t t c g g c g g a g g g a c c a a g c t g a c c g t c c t a 330

- <210> 184
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 15 <223> Anticuerpo 13

ES 2 399 475 T3

<400> 184
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Leu Ala Asn Tyr
 20 25 30
 Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
 35 40 45
 Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Pro
 85 90 95
 Arg Val Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

5 <210> 185
 <211> 330
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 10 <223> Anticuerpo 14
 <400> 185
 aatatttatgc tgactcagcc ccactctgtg tccggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
 tcctgcaccc gcagcagtg cagccttgcc aactactatg tgcagtggta ccaacagcgc 120
 ccgggcagtg cccccacat tgtgatcttt gcgaataacc aaagaccctc tggggtcctt 180
 gatcgattct ctggctccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctaga 240
 ctgaagactg aggacgagggc tgactactac tgccagtctt atgacccgac gaaccaggtg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
 <210> 186
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 14

ES 2 399 475 T3

<400> 186

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

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

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
35 40 45

Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Pro
85 90 95

Thr Asn Gln Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

- 5 <210> 187
- <211> 330
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 10 <223> Anticuerpo 15
- <400> 187
- aattttatgc tgactcagcc ccactctgtg tcggagtctc cggggaagac ggtaaccatc 60
- tctgcacccc gcagcagtg gacgcttgcc aactactatg tgcagtggtta ccaacagcgc 120
- ccgggcagtg cccccacccat tgtgatcttt gcgaataacc aaagaccctc tggggtcctt 180
- gatcgattct ctggtccat cgacagctcc tccaactctg cctccctcac catctctaga 240
- ctgaagactg aggacgagc tgactactac tgccagtcct actccccgac gagcgtgggtg 300
- ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 330
- <210> 188
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 15 <223> Anticuerpo 15

ES 2 399 475 T3

<400> 188
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
 1 5 10 15

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

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ala Pro Thr Ile Val
 35 40 45

Ile Phe Ala Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ser Pro
 85 90 95

Thr Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

5 <210> 189
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

10 <223> región 1 marco VH
 <400> 189
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

<210> 190
 <211> 14

15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

<223> región 2 marco VH
 <400> 190
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

20 <210> 191
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <220>

<223> región 3 marco VH
 <400> 191
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

30 <210> 192
 <211> 11

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> región 4 marco VH
 5 <400> 192
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
 <210> 193
 <211> 22
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> región 1 marco VL
 <400> 193
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys
20
 15 <210> 194
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 20 <223> región 2 marco VL
 <400> 194
Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Ile Val Ile Phe
1 5 10 15
 <210> 195
 <211> 34
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> región 3 marco VL
 <400> 195
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser
1 5 10 15

Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
20 25 30

Tyr Cys
 <210> 196
 <211> 10
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> región 4 marco VL
 <400> 196
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10
 <210> 197
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Secuencia sintética: IL-17A humana etiquetada N-terminalmente

ES 2 399 475 T3

<400> 197

Met Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His
 1 5 10 15

Glu Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro
 20 25 30

Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn
 35 40 45

Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr
 50 55 60

Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro
 65 70 75 80

Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly
 85 90 95

Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro
 100 105 110

Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro
 115 120 125

Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys
 130 135 140

Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
 145 150

- 5 <210> 198
- <211> 132
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 10 <223> IL-17A humana madura

ES 2 399 475 T3

<400> 198

Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys
1 5 10 15

Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn
20 25 30

Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr
35 40 45

Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser
50 55 60

Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp
65 70 75 80

Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile
85 90 95

Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu
100 105 110

Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val
115 120 125

His His Val Ala
130

<210> 199

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Péptido IL-17A humano

<400> 199

Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His
1 5 10 15

10 Met

<210> 200

<211> 160

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia sintética: Precursor de IL-17A mutante con etiqueta His

ES 2 399 475 T3

<400> 200

Met Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu Ser
1 5 10 15

Leu Glu Ala Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly
20 25 30

Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn
35 40 45

Leu Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser
50 55 60

Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu
65 70 75 80

Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His
85 90 95

Gln Arg Cys Val Asn Ala Glu Gly Lys Leu Asp His His Met Asn Ser
100 105 110

Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His
115 120 125

Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys
130 135 140

Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala His His His His His
145 150 155 160

5

<210> 201

<211> 132

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Secuencia sintética: IL-17A mutante madura

ES 2 399 475 T3

<400> 201

Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys
 1 5 10 15

Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn
 20 25 30

Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr
 35 40 45

Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser
 50 55 60

Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Gln Arg Cys Val Asn Ala Glu
 65 70 75 80

Gly Lys Leu Asp His His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile
 85 90 95

Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu
 100 105 110

Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val
 115 120 125

His His Val Ala
 130

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de anticuerpo aislada capaz de unirse a la IL-17A humana, que comprende un conjunto de CDRs: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde el conjunto de CDRs tienen cero, una o dos sustituciones de aminoácido a partir de un conjunto de CDRs en el cual:
- HCDR1 es la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 63;
HCDR2 es la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 64;
HCDR3 es la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 65;
LCDR1 es la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 68;
LCDR2 es la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 69; y
LCDR3 es la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 70; las sustituciones se escogen de:
- (a) una HCDR1 en donde el residuo de Kabat 31 es Ser, Ala, Gly, Thr o Cys y el residuo de Kabat 32 es Tyr;
(b) una HCDR2 en donde el residuo de Kabat 58 es Tyr o Phe;
(c) una HCDR3 en donde el residuo de Kabat 96 es un residuo hidrófobo, el residuo de Kabat 97 es un residuo hidrófobo y el residuo de Kabat 98 es un residuo cíclico;
(d) una HCDR3 en donde el residuo de Kabat 96 es un residuo hidrófobo seleccionado de Leu, Ile, Val, Ala o Phe, el residuo de Kabat 97 es un residuo hidrófobo y el residuo de Kabat 98 es un residuo cíclico;
(e) una HCDR3 en donde el residuo de Kabat 96 es un residuo hidrófobo, el residuo de Kabat 97 es un residuo hidrófobo seleccionado de Ile, Leu, Val, Ala o Phe; o
(f) una HCDR3 en donde el residuo de Kabat 96 es un residuo hidrófobo, el residuo de Kabat 97 es un residuo hidrófobo y el residuo de Kabat 98 es un residuo cíclico seleccionado de His, Trp o Phe.
2. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una afinidad para unirse a la IL-17A humana madura que tiene una secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 198 que es más que 10-veces mayor que para unir la IL-17A humana mutante que tiene la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 201, en donde la afinidad es Kd calculada a partir del índice de constantes de velocidad kd1/ka1 determinado por resonancia de plasmones superficiales usando un modelo de datos de analito bivalente.
3. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la molécula de anticuerpo no se une a la IL-17A humana mutante que tiene la secuencia de aminoácido sec. con núm. de ident.: 201.
4. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde
- (a) la unión de la molécula de anticuerpo a IL-17A humana no se inhibe en más del 50% por 1 µM de ninguna de las IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E o IL-17F en un ensayo de competencia de epítopos por medio del uso de la IL-17A etiquetada a una concentración igual a la Kd de la interacción de la molécula de anticuerpo con la IL-17A humana, en donde dicha Kd se calcula a partir de la relación de constantes de velocidad kd1/ka1 según se determinó por la resonancia de plasmones superficiales por medio del uso de un modelo de datos de analito bivalente;
(b) la molécula de anticuerpo tiene una afinidad por la IL-17A de cinomolgo que es menos de 5-veces diferente de su afinidad por la IL-17A humana, en donde la afinidad es Kd calculada a partir de la relación de constantes de velocidad kd1/ka1 según se determinó por la resonancia de plasmones superficiales por medio del uso de un modelo de datos de analito bivalente; o
(c) la IC50 de la molécula de anticuerpo en un ensayo de células HT1080 de liberación de IL-6 en respuesta a 1 nM IL-17A humana difiere en no más de 10-veces a partir de la IC50 de la molécula de anticuerpo en un ensayo de células HT1080 de liberación de IL-6 en respuesta a 1 nM de IL-17A de cinomolgo.
5. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende:
- (a) una LCDR1 en donde el residuo de Kabat 31 es Tyr o Phe y el residuo de Kabat 32 es Tyr o Phe; o
(b) una LCDR3 en donde el residuo de Kabat 91 es Tyr y el residuo de Kabat 93 es Pro, hidroxiprolina, His o 3-metilhistidina.
6. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende un conjunto de CDRs: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde:

- (a) el residuo de Kabat 31 de HCDR1 es Ser, Ala, Gly, Thr o Cys;
 el residuo de Kabat 32 de HCDR1 es Tyr;
 el residuo de Kabat 58 of HCDR2 es Tyr o Phe;
 el residuo de Kabat 96 of HCDR3 es un residuo hidrófobo;
 el residuo de Kabat 97 of HCDR3 es un residuo hidrófobo;
 el residuo de Kabat 98 of HCDR3 es un residuo cíclico;
 el residuo de Kabat 31 of LCDR1 es Tyr o Phe;
 el residuo de Kabat 32 of LCDR1 es Tyr o Phe;
 en el residuo de Kabat 91 de LCDR3 es Tyr; y
 el residuo de Kabat 93 de LCDR3 es Pro, hidroxiprolina, His o 3-metilhistidina.
 (b) la molécula de anticuerpo comprende una HCDR3 en donde el residuo de Kabat 98 es His;
 (c) la molécula de anticuerpo comprende una LCDR3 en donde el residuo de Kabat 93 es Pro;
 (d) el residuo de Kabat 31 de HCDR1 es Ser;
 el residuo de Kabat 32 de HCDR1 es Tyr;
 el residuo de Kabat 58 de HCDR2 es Tyr;
 el residuo de Kabat 96 de HCDR3 es Leu;
 el residuo de Kabat 97 of HCDR3 es Ile;
 el residuo de Kabat 98 of HCDR3 es His;
 el residuo de Kabat 31 de LCDR1 es Tyr;
 el residuo de Kabat 32 de LCDR1 es Tyr;
 en el residuo de Kabat 91 de LCDR3 es Tyr; y
 el residuo de Kabat 93 de LCDR3 es Pro;
 (e) la molécula de anticuerpo comprende una HCDR3 secuencia en donde HCDR3 es sec. con núm. de ident.: 65; o
 (f) la molécula de anticuerpo comprende una LCDR3 secuencia en donde LCDR3 es sec. con núm. de ident.: 70.
7. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde
- (a) la molécula de anticuerpo tiene una IC50 de no más que 1 nM según se determinó en un ensayo de células HT1080 de liberación de IL-6 en respuesta a 1 nM de IL-17A humana;
 (b) la molécula de anticuerpo tiene una IC50 de no más que 0.5 nM según se determinó en un ensayo de células HT1080 de liberación sinérgica de IL-6 en respuesta a 125 pM IL-17A humana y 25 pM TNF α ;
 (c) la molécula de anticuerpo tiene una Kd para la IL-17A humana menos de 2.5 nM calculada a partir de la relación de constantes de velocidad kd1/ka1 según se determinó por la resonancia de plasmones superficiales por medio del uso de un modelo de datos de analito bivalente; o
 (d) la molécula de anticuerpo tiene una IC50 de no más que 1 nM medida en un ensayo de células HT1080 que mide la liberación de IL-6 en respuesta a 1 nM de IL-17A humana, y en donde dicha IC50 difiere en no más de 10-veces de la IC50 de la molécula de anticuerpo según se midió en un ensayo de células HT1080 que mide la liberación de IL-6 en respuesta a 1 nM de IL-17A de cinomolgo.
8. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la molécula de anticuerpo comprende un dominio VH de anticuerpo y un dominio VL de anticuerpo, en donde la molécula de anticuerpo comprende un conjunto de CDRs: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde el dominio VH comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y las regiones marco de cadena pesada FR1, FR2, FR3 y FR4, y el dominio VL comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y regiones marco de cadena ligera FR1, FR2, FR3 y FR4.
9. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el dominio VH de anticuerpo tiene la secuencia de aminoácido de dominio VH mostrada en la sec. con núm. de ident.: 62.
10. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el dominio VL de anticuerpo tiene la secuencia de aminoácido de dominio VL mostrada en la sec. con núm. de ident.: 176.
11. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde la molécula de anticuerpo comprende un dominio VH con la secuencia de aminoácido de dominio VH mostrada en la sec. con núm. de ident.: 62 y un dominio VL con la secuencia de aminoácido de dominio VL mostrada en la sec. con núm. de ident.: 176.

- 5
12. Una molécula de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 11, la cual es una IgG.
13. Una composición que comprende una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. Una composición que comprende una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para usar en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía o terapia.
- 10 15. Una composición de acuerdo con la reivindicación 14 para usar en el tratamiento de un trastorno asociado con la IL-17A, en donde el trastorno es un trastorno inflamatorio; o en donde el trastorno es artritis reumatoide, osteoartritis, pérdida ósea, hipersensibilidad de las vías aéreas, un trastorno desmielinizante, soriasis, hipersensibilidad dérmica, rechazo agudo al trasplante, rechazo al aloinjerto, enfermedad del huésped contra el injerto, esclerosis sistémica, lupus eritematoso sistémico, una enfermedad inflamatoria del intestino autoinmune, un trastorno inflamatorio urológico, una enfermedad cardiovascular, vasculitis, una fiebre periódica, un trastorno del metabolismo de la glucosa, una enfermedad pulmonar, un cáncer, peridontitis, queratitis estromal herpética, una alergia, artritis reactiva, dolor inflamatorio, una espondiloartropatía, septicemia, choque séptico o endotóxico, meningitis, trauma quirúrgico, un trastorno autoinmune hematológico, enfermedad de Alzheimer, sarcoidosis, cirrosis, hepatitis, glomerulonefritis o dislipidemia.
- 15 20 16. Una composición de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el trastorno es la artritis reumatoide.
17. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica: una molécula de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 25 18. Una célula huésped transformada *in vitro* con ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 17.
19. Un método para producir una molécula de anticuerpo, que comprende cultivar células huésped de acuerdo con la reivindicación 18 bajo condiciones para la producción de la molécula de anticuerpo.
- 30 20. Un método para producir una composición que comprende una molécula de anticuerpo, que comprende: producir una molécula de anticuerpo por el método de la reivindicación 19; y formular la molécula de anticuerpo en una composición que comprende al menos un componente adicional.

MGGLNDIFEAQKIEWHEIVKAGITIPRNPGCNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDY
YNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCP
NSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA

Figura 1

MTPGKTSLVSLLLLLSLEAIVKAGITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSS
DYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHORCVNAEGKLDHHMNSVPIQQEILVLRREPPH
CPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVAHHHHH

Figura 2