

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 832**

51 Int. Cl.:

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.09.2013 E 13766014 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2872163**

54 Título: **Nuevas moléculas de unión a IL-17A y usos médicos de las mismas**

30 Prioridad:

21.09.2012 EP 12185425

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

22.09.2016

73 Titular/es:

**COVAGEN AG (100.0%)
Gubelstrasse 34
6300 Zug, CH**

72 Inventor/es:

**SILACCI MELKKO, MICHELA;
BÄNZIGER, NADJA;
WOODS, RICHARD;
ZHA, WENJUAN;
ATTINGER, ISABELLA;
SANTIMARIA, ROGER;
LEMBKE, WIBKE;
BATEY, SARAH;
VON DER BEY, ULRIKE;
BERTSCHINGER, JULIAN y
GRABULOVSKI, DRAGAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 583 832 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

Nuevas moléculas de unión a IL-17A y usos médicos de las mismas

5 La presente invención se refiere a un polipéptido que inhibe la actividad de IL-17A glucosilada, en el que el polipéptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) GVTLFVALYDY(X¹)(X²)(X³)(X⁴)(X⁵)(X⁶)DLSFHKGEKFKQIL STHEYEDWWEARSLTGETGYIPSNYVAPVDSIQ (SEQ ID NO: 1), en la que las posiciones de los aminoácidos (X¹) a (X⁶) pueden ser cualquier secuencia de aminoácidos; y (b) una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a), en la que la determinación de la identidad excluye las posiciones de los aminoácidos (X¹) y (X⁶) y siempre que la secuencia de aminoácidos STHEYE (SEQ ID NO: 2) en las posiciones de los aminoácidos 31 a 36 de la SEQ ID NO: 1 se conserve. La invención también se refiere a construcciones de fusión, composiciones y usos médicos que comprenden dicho polipéptido.

15 En esta memoria descriptiva, se citan una serie de documentos que incluyen solicitudes de patente y manuales del fabricante. La divulgación de estos documentos, aunque no considerada relevante para la patentabilidad de esta invención, se mencionan en el presente documento. Las células T CD4+ juegan un papel central en orquestar respuestas inmunitarias ayudando a otras células del sistema inmunitario adaptativo o innato. En estudios tempranos, se identificaron dos clases de células T CD4+ (Th1 y Th2). Más recientemente, se identificó un nuevo subconjunto de células T CD4+, el linaje Th17. Las células Th17 parecen haber evolucionado como una rama del sistema inmunitario adaptativo especializadas en protección del huésped mejorada contra bacterias extracelulares así como algunos hongos y microbios no bien cubiertos por inmunidad por Th1 o Th2.

25 Las células Th17 se identificaron en el contexto del descubrimiento de una nueva familia de citoquinas, la familia IL-17, que se sabe actualmente que comprende seis miembros (IL-17A-F). IL-17 (denominada previamente CTLA-8) es expresada principalmente por células Th17 y se designó IL-17A para indicar que es el miembro fundador de esta familia de citoquinas. La interleuquina-17A humana (IL-17) es una citoquina pleiotrópica, proinflamatoria que es clave para la definición del linaje de células T CD4+ auxiliares 17 (TH17), tal como se ha mencionado anteriormente (Miossec P. et al. (2009) N. Engl. J. Med. 361, p. 888-898). IL-17A es una molécula homodimérica y, después de la escisión de un péptido señal de 23 aminoácidos, es secretada como un homodímero unido covalentemente glucosilado (secuencia de referencia NCBI: NP_002181.1; identificador UniProtK: Q16552; SEQ ID: 10). La digestión con F-endoglucosidasas desplaza el peso molecular aparente de IL-17A humana expresada por células de mamífero de 22 a 15 kDa en SDS-PAGE reductora, demostrando de este modo que la citoquina está glucosilada (Fossiez F. et al. (1998) Int Rev Immunol. 16(5-6); p. 541-551).

35 La identificación de células Th17 como mediadores centrales en procesos inflamatorios crónicos y como efectores patógenos principales en varios tipos de afecciones de autoinmunidad que previamente se creía que eran mediadas por Th1 promete nuevos enfoques terapéuticos (Weaver T. et al. (2008) Annu. Rev. Immunol., 25, p. 821-852). De hecho, la citoquina proinflamatoria IL-17 es expresada principalmente por células Th17 y está presente a niveles elevados en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR) y ha demostrado estar implicada en el desarrollo de AR temprana. Además, IL-17 es un potente inductor de TNF-alfa e IL-1, siendo el último principalmente responsable de la erosión ósea y las muy dolorosas consecuencias para los pacientes afectados (Lubberts E. (2008) Cytokine, 41, p. 84-91). Además, la producción inapropiada o excesiva de IL-17 está asociada con la patología de diversas otras enfermedades y trastornos, tales como artrosis, aflojamiento de implantes óseos, rechazo de trasplante agudo (Antonysamy et al., (1999) J. Immunol, 162, p. 577-584; van Kooten et al. (1998) J. Am. Soc. Nephrol., 9, p.1526-1534), septicemia, choque séptico o endotóxico, alergias, asma (Molet et al. (2001) J. Allergy Clin. Immunol., 108, p. 430-438), pérdida ósea, psoriasis (Teunissen et al. (1998) J. Invest. Dermatol, 111, p. 645-649), isquemia, esclerosis sistémica (Kurasawa et al. (2000) Arthritis Rheum., 43, p. 2455-2463), ictus, y otros trastornos inflamatorios.

50 En consecuencia, compuestos anti-IL-17 tienen potencial como agentes antiinflamatorios, un enfoque terapéutico en línea con una serie de estudios *in vivo* que demuestran que la neutralización de IL-17 reduce procesos inflamatorios tales como artritis. Por ejemplo, la neutralización temprana de IL-17 endógeno por una proteína de fusión receptor de IL-17-IgG1-Fc que comienza después del protocolo de inmunización durante la fase inicial de artritis suprime la aparición de artritis experimental (Lubberts et al. (2001) J. Immunol., 167, p. 1004-1013). Además, el tratamiento con un anticuerpo anti-IL-17 neutralizante en un modelo animal después de la aparición de artritis inducida por colágeno redujo la inflamación articular, la destrucción del cartilago y la erosión ósea (Lubberts et al. (2004) Arthritis and Rheumatism, 50; 650-659). Un análisis histológico confirmó la supresión de la inflamación articular, y los niveles de IL-6 sistémica disminuyeron significativamente después del tratamiento con un anticuerpo anti-IL-17. En contraste, la sobreexpresión de IL-17 sistémica así como local usando un vector adenoviral que expresa IL-17 murina aceleraba la aparición de artritis inducida por colágeno (AIC) y agravaba la inflamación sinovial en el sitio (Lubberts et al. (2001) J. Immunol., 167, p. 1004-1013 y Lubberts et al. (2002), Inflamm. Res. 51, p 102-104). Más recientemente pudo demostrarse que el uso de anticuerpos anti-IL-17 mejoraba los síntomas clínicos de psoriasis, artritis reumatoide y uveítis no infecciosa (Leonardi C. et al. (2012) N. Engl. J. Med. 366, p. 1190-1199; Hueber W. et al. (2010) Sci Transl Med. 2(52): 52ra72).

Agentes monoespecíficos se usan ampliamente para el tratamiento de diversas enfermedades diferentes. La mayoría de los productos biológicos comercializados son monoespecíficos y, por lo tanto, capaces de interactuar e interferir con una única diana. Sin embargo, las enfermedades complejas a menudo son de naturaleza multifactorial, e implican acciones redundantes o sinérgicas de mediadores de enfermedad. En consecuencia, el bloqueo de múltiples factores y rutas patológicas diferentes puede dar como resultado una eficacia terapéutica mejorada (Konterman R.E. (2012) mAbs, 4: 2, p. 182-197).

Además de IL-17A, una molécula clave adicional implicada en la etiología de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias y relacionadas con la pérdida ósea, en particular en las diversas formas de artritis que incluyen artritis reumatoide es el factor de necrosis tumoral (TNF). Varios productos terapéuticos anti-TNF han sido aprobados para el tratamiento de artritis reumatoide, psoriasis, artritis sorriásica, espondilitis anquilosante y morbo de Crohn, y están siendo ensayados en la clínica para otras afecciones inflamatorias. Actualmente existen cinco clases de productos biológicos disponibles para el tratamiento de artritis inflamatoria, que inhiben, cada una, un aspecto diferente de la ruta inflamatoria impulsada por reacción inmunitaria (revisado en Scott D.L. (2012) Clin Pharmacol Ther., 91(1), p. 31-43): (i) inhibidores de TNF (adalimumab, etanercept, infliximab, certolizumab, golimumab), (ii) antagonista del receptor de interleuquina-1 (anakinra), (iii) inhibición de células B (rituximab) (iv) inhibición de coestimulación de células T (abatacept) y (v) inhibición de interleuquina-6 (tocilizumab). Otros productos biológicos aprobados para el tratamiento de afecciones inflamatorias comprenden canakinumab (anti-IL-1beta) y ustekinumab (anti-IL-12/23) (Reichert J.M. (2012) mAbs, 4:3, p. 413-415). Moléculas de unión a TNF que están diseñadas para aplicaciones terapéuticas también se describen en Tak y Kalden (2011) (Arthritis Research and Therapy, 13; 1-14).

Koenders et al. (2011) (Arthritis and Rheumatism, 63; 2329-2339) describen que la interacción entre TNF y IL-17 desencadena mecanismos moleculares que causan destrucción de cartílago irreversible en un modelo animal de artritis. Además, ha sido descubierto por los autores que la combinación de un receptor de interleuquina-17 soluble y una proteína de unión a TNF era más eficaz en el tratamiento de artritis que cualquier tratamiento anti-citoquina en solitario. La molécula de unión a TNF descrita en la publicación de Koenders et al. (2011) es un receptor I de TNF de p55 soluble PEGilado enlazado de forma dimérica. El documento WO 2010/102251 describe proteínas de unión que comprenden primera y segunda cadenas polipeptídicas, en las que la proteína de unión es capaz de unirse a IL-17 y TNF humanos. Ambas cadenas polipeptídicas tienen una arquitectura molecular formada por dominios variable y constante de anticuerpo. Varias otras proteínas de fusión biespecíficas y/o multiespecíficas se han descrito en la bibliografía (véase la revisión Konterman R.E. (2012) mAbs, 4:2, p. 182-197).

Polipéptidos derivados de SH3 de Fyn se conocen bien en la técnica y han sido descritos por ejemplo en Grabulovski et al. (2007) JBC, 282, p. 3196-3204; el documento WO 2008/022759; Bertschinger et al (2007) Protein Eng Des Sel 20(2):57-68; y Gebauer y Skerra (2009) Curr Opin in Chemical Biology 13: 245-255. La expresión "polipéptido derivado de SH3 de Fyn", usada de forma intercambiable en el presente documento con el término "Fynomer", se refiere a un (poli)péptido de unión derivado no de inmunoglobulina (por ejemplo una llamada matriz de soporte tal como se describe en Gebauer y Skerra (2009) Curr Opin in Chemical Biology 13: 245-255) derivado del dominio SH3 de Fyn humana. El dominio SH3 de la Fyn quinasa humana se usó con éxito como matriz de soporte para genomanipular proteínas (proteínas de unión derivadas de SH3 de Fyn denominadas Fynomers) que se unen con alta afinidad y especificidad a diferentes proteínas diana (WO 2008/022759, WO 2011/023685, Grabulovski D. et al., (2007) J Biol Chem 282, p. 3196-3204, Bertschinger J. et al. (2007) Protein Eng Des Sel, 20, p. 57-68, y Schlatter et al. (2012) mAbs, 4(4) p. 497-50).

El documento WO 2011/023685 describe polipéptidos que inhiben IL-17 ("Fynomers"), proteínas de fusión correspondientes, composiciones y usos médicos de las mismas. Estos polipéptidos que inhiben IL-17 tienen alta especificidad y alta afinidad por IL-17A. El problema técnico que subyace a la presente invención es la provisión de polipéptidos que inhiben IL-17A adicionales y, en particular, dichos polipéptidos que inhiben IL-17A que estén técnicamente mejorados. Este problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Por consiguiente, la presente invención se refiere, en una primera realización, a un polipéptido que inhibe la actividad de IL-17A glucosilada, en el que el polipéptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) GVTLFVALYDY(X¹)(X²)(X³)(X⁴)(X⁵)(X⁶)DLSFHKGEKFQILSTHEYEDWWEARSLTTGETGYIP SNYVAPVDSIQ (SEQ ID NO: 1), en el que las posiciones de los aminoácidos (X¹) a (X⁶) pueden ser cualquier secuencia de aminoácidos; y (b) una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a), en el que la determinación de la identidad excluye las posiciones de los aminoácidos (X¹) a (X⁶) y siempre que la secuencia de aminoácidos STHEYE (SEQ ID NO: 2) en las posiciones de los aminoácidos 31 a 36 de la SEQ ID NO: 1 se conserve. La invención también se refiere a construcciones de fusión, composiciones y usos médicos que comprenden dicho polipéptido.

La presente invención se refiere, en una segunda realización, a un polipéptido que se une a IL-17A glucosilada y que preferentemente inhibe la actividad de la misma, en el que el polipéptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) GVTLFVALYDY(X¹)(X²)(X³)(X⁴)(X⁵)(X⁶)DLSFHKGEKFQILSTHEYEDWWEARSLTTGETGYIP SNYVAPVDSIQ (SEQ ID NO: 1), en el que las posiciones de los aminoácidos (X¹) a (X⁶) pueden ser cualquier secuencia de aminoácidos; y (b) una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a), en el que la determinación de la identidad excluye las posiciones de los aminoácidos (X¹) a (X⁶) y siempre que la secuencia de aminoácidos STHEYE (SEQ ID NO: 2) en las posiciones de los aminoácidos 31 a 36 de la SEQ ID NO: 1 se conserve. La invención también se refiere a construcciones de fusión, composiciones y usos médicos que comprenden dicho polipéptido.

Las siguientes definiciones, ejemplos, realizaciones preferidas e independientes se refieren tanto a la primera como a la segunda realización de la invención.

El término "polipéptido", tal como se usa en el presente documento, describe cadenas de aminoácidos moleculares lineales, que incluyen proteínas de cadena sencilla o sus fragmentos, que contienen más de aproximadamente 50 aminoácidos. Los polipéptidos pueden formar además multímeros, por ejemplo oligómeros, que consisten en al menos dos moléculas idénticas o diferentes. Las estructuras de orden superior correspondientes de dichos multímeros se denominan, de forma correspondiente, homo- o heterodímeros, homo- o heterotrímeros, etc. Además, peptidomiméticos de dichos polipéptidos donde aminoácidos y/o enlaces peptídicos han sido sustituidos por análogos funcionales también son abarcados por la invención. Dichos análogos funcionales incluyen todos los aminoácidos conocidos diferentes de los 20 aminoácidos codificados en un gen, tales como selenocisteína. El término "polipéptido" también se refiere a polipéptidos modificados de forma natural donde la modificación se realiza, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, fosforilación y modificaciones similares que se conocen bien en la técnica.

También están comprendidos por la presente invención fragmentos del polipéptido de la invención que conservan sustancialmente unión a IL-17A glucosilada. A este respecto, se prefiere con preferencia creciente que los fragmentos comprendan al menos 30 aminoácidos, al menos 35 aminoácidos, al menos 40 aminoácidos o al menos 45 aminoácidos, siempre que los fragmentos contengan menos de aproximadamente 55 aminoácidos. Se prefiere, además, que en el fragmento las posiciones de los aminoácidos correspondientes al bucle RT- y src- tal como se definen a continuación en el presente documento, se mantengan.

La expresión "polipéptido que inhibe la actividad de IL-17A glucosilada", tal como se usa en el presente documento, define que el polipéptido tiene la capacidad de reducir o suprimir completamente la actividad de IL-17A glucosilada, actividad que se ha descrito anteriormente en el presente documento en detalle. A este respecto, se prefiere que inhibir la actividad de IL-17A glucosilada signifique la unión de IL-17A glucosilada a un receptor de la superficie celular de tipo I llamado IL-17R (receptor de interleuquina 17). Al menos tres variantes de IL-17R, concretamente IL17RA, IL17RB e IL17RC, se conocen en la técnica. A este respecto, se prefiere además, con preferencia creciente, que el polipéptido inhiba la actividad de IL-17A glucosilada en al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o el 100 %. También se prefiere, con preferencia creciente, que el valor de CI₅₀ para la inhibición de IL-17A glucosilada de los polipéptidos de la invención sea de 1000 nM o menos, 500 nM o menos, 400 nM o menos, 300 nM o menos, 200 nM o menos, 100 nM o menos, o 75 nM o menos. A este respecto, se prefiere que los polipéptidos de la invención inhiban específicamente la actividad de IL-17A glucosilada y, por lo tanto, no inhiban otras proteínas relacionadas tales como IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E o IL-17F glucosiladas. El polipéptido de la invención inhibe la actividad de IL-17A glucosilada. Se prefiere que el polipéptido inhiba la actividad de IL-17A glucosilada y no glucosilada. Por lo tanto, las definiciones anteriores se aplican *mutatis mutandis* a la inhibición de IL-17A no glucosilada.

Debe entenderse que inhibir la actividad de IL-17A glucosilada también implica unión a IL-17A glucosilada. A este respecto, se prefiere que la unión a IL-17A glucosilada también cause la inhibición de la actividad de IL-17A glucosilada. La expresión "unión a IL-17A glucosilada" requiere que los polipéptidos o fragmentos de la invención formen interacciones de unión (*in vivo* y/o *in vitro*) con IL-17A glucosilada. Preferentemente, los polipéptidos de la invención se unen a IL-17A glucosilada con una K_D de 10⁻⁷ a 10⁻¹² M, más preferentemente de 10⁻⁸ a 10⁻¹² M, de la forma más preferente de 10⁻⁹ a 10⁻¹² M. A este respecto, se prefiere que los polipéptidos de la invención se unan específicamente a IL-17A y, por lo tanto, no se unan a otras proteínas relacionadas tales como IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E o IL-17F. El polipéptido de la invención se une a IL-17A glucosilada. Se prefiere que el polipéptido se una a IL-17A glucosilada y no glucosilada. Por lo tanto, las definiciones anteriores se aplican *mutatis mutandis* a la unión de IL-17A no glucosilada.

La SEQ ID NO: 1 tal como se ha mencionado anteriormente en el presente documento se deriva de la secuencia de aminoácidos del dominio SH3 de la Fyn quinasa humana (SEQ ID NO: 20; aa 83-145 de Fyn quinasa, según lo descrito por Kawakami et al., y Semba et al., en 1986). La SEQ ID NO: 20 se lee: GVTLFVALYDYEARTEDDLSFHKGEKFQILNSSEGDWWEARSLTTGETGYIPSNYVAPVDSI Q (SEQ ID NO: 20). En la SEQ ID NO: 20, tal como se ha mostrado anteriormente, las secuencias del bucle RT y src están subrayadas y subrayadas doblemente, respectivamente. Grabulovski et al. (2007) JBC, 282, investigaron la influencia de las mutaciones en los bucles RT y src de dominios SH3 de Fyn y demostraron que las mutaciones en ambos bucles que son adyacentes a la superficie hidrófoba podrían determinar la capacidad de este dominio para participar en

asociaciones intermoleculares. Además, el documento EP 2054432 muestra que mutaciones en y adyacentes al bucle RT y/o src determinan la especificidad de unión de un dominio SH3. La secuencia de aminoácidos del SH3 de Fyn se conserva completamente entre ser humano, ratón, rata y mono (gibón). El SH3 de Fyn de pollo difiere en una, la de *Xenopus laevis* en dos posiciones de aminoácidos del dominio humano correspondiente. Justamente como otros dominios SH3, el SH3 de Fyn está compuesto por dos láminas β antiparalelas y contiene dos bucles flexibles (llamados bucles RT y src) a fin de interactuar con otras proteínas.

En más detalle, la SEQ ID NO: 1 es una secuencia que resulta de un alineamiento de las SEQ ID NO: 3 a 9 (véase la figura 8). Tal como es evidente a partir de la figura 8, las posiciones (X^1) a (X^6) de la SEQ ID NO: 1 corresponden al bucle RT del dominio SH3 de Fyn quinasa de la SEQ ID NO: 20. A este respecto, se prefiere que las posiciones de los aminoácidos (X^1) a (X^6) del polipéptido de la invención no tengan la secuencia EARTED (SEQ ID NO: 19). Tal como es evidente, además, a partir de la figura 8, las posiciones correspondientes al bucle src del dominio SH3 de Fyn quinasa SH3 de la SEQ ID NO: 20, concretamente la secuencia "STHEYE" (subrayada en la SEQ ID NO: 1 tal como se ha mostrado anteriormente en el presente documento) se conservan entre las SEQ ID NO: 3 a 9. Las posiciones de los aminoácidos dentro del bucle RT y src determinan la especificidad de unión a la IL-17A glucosilada.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "porcentaje (%) de identidad de secuencia" describe el número de coincidencias ("aciertos") de nucleótido/aminoácidos idénticos de dos o más secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico alineadas en comparación con el número de nucleótidos o residuos de aminoácidos que componen la longitud global de las secuencias de ácido nucleico o aminoácidos plantilla. En otras palabras, usando un alineamiento, para dos o más secuencias o subsecuencias, puede determinarse el porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (por ejemplo 85 %, 90 % o 95 % de identidad), cuando las (sub)secuencias se comparan y se alinean para máxima correspondencia en una ventana de comparación, o sobre una región designada, según lo medido usando un algoritmo de comparación de secuencias, tal como se conoce en la técnica, o cuando se alinean de forma manual y se inspeccionan visualmente. Las secuencias que se comparan para determinar la identidad de secuencia pueden diferir, por lo tanto, por sustitución(es), adición(es) o deleción(es) de nucleótidos o aminoácidos. Esta definición también se aplica a la totalidad de una secuencia de ensayo.

El experto en la materia también está al tanto de programas adecuados para alinear secuencias de ácido nucleico. El porcentaje de identidad de secuencia de secuencias polipeptídicas puede, por ejemplo, determinarse con programas tales como los programas explicados anteriormente CLUSTLAW, FASTA y BLAST. Preferentemente, se usa el programa BLAST, concretamente el algoritmo NCBI BLAST (Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402).

Con respecto a la identidad de secuencia, tal como se menciona en el punto (b) anteriormente en el presente documento, se prefiere con preferencia creciente que la identidad de secuencia sea al menos el 90 %, al menos el 95 %, o al menos el 98 %.

La frase "la determinación de la identidad excluye las posiciones de los aminoácidos (X^1) a (X^6)", tal como se usa en el presente documento, especifica que el cálculo de la identidad de secuencia con respecto a la SEQ ID NO: 1 no tiene en cuenta las posiciones de los aminoácidos (X^1) a (X^6) sino que está confinada al resto de las posiciones de 58 aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. La condición "siempre que la secuencia de aminoácidos STHEYE (SEQ ID NO: 2) en las posiciones de los aminoácidos 31 a 36 de la SEQ ID NO: 1 se conserve", tal como se usa en el presente documento, especifica que no se pueden introducir cambios de aminoácidos en las posiciones de los aminoácidos 31 a 36 de la SEQ ID NO: 1. En otras palabras, las posiciones de los aminoácidos correspondientes a la posición de aminoácidos 31 a 36 de la SEQ ID NO: 1 tienen la secuencia STHEYE (SEQ ID NO: 2) en todos los polipéptidos que están en el ámbito de la primera realización de la invención y los ejemplos preferidos de la misma.

A este respecto, se prefiere que las posiciones de los aminoácidos correspondientes a la posición de aminoácidos 31 a 37 de la SEQ ID NO: 1 tengan la secuencia STHEYED (SEQ ID NO: 18) en todos los polipéptidos que estén en el ámbito de la primera realización de la invención y los ejemplos preferidos de la misma. En otras palabras, se prefiere, con respecto a la primera realización de la invención y los ejemplos preferidos de la misma, que se cumpla la condición de que la secuencia de aminoácidos STHEYED (SEQ ID NO: 18) en las posiciones de los aminoácidos 31 a 37 de la SEQ ID NO: 1 se conserve.

Cualquier sustitución de aminoácidos en la SEQ ID NO: 1 es preferentemente una sustitución de aminoácidos conservativa. Una sustitución conservativa especifica la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una propiedad química similar al aminoácido que es sustituido. Preferentemente, la sustitución conservativa, tal como se menciona en el presente documento, es una sustitución seleccionada del grupo que consiste en: (i) una sustitución de un aminoácido básico con un aminoácido básico diferente; (ii) una sustitución de un aminoácido ácido con un aminoácido ácido diferente; (iii) una sustitución de un aminoácido aromático con un aminoácido aromático diferente; (iv) una sustitución de un aminoácido alifático, no polar con un aminoácido alifático, no polar diferente; y (v) una sustitución de un aminoácido no cargado, polar con un aminoácido no cargado, polar diferente. Son aminoácidos básicos arginina, histidina y lisina. Son aminoácidos ácidos aspartato o glutamato. Son aminoácidos

aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano. Son aminoácidos alifáticos, no polares glicina, alanina, valina, leucina, metionina, isoleucina y prolina. Son aminoácidos no cargados, polares serina, treonina, cisteína, asparagina y glutamina. En contraste a una sustitución de aminoácidos conservativa, una sustitución de aminoácidos no conservativa es el intercambio de un aminoácido con cualquier aminoácido que no está dentro de las sustituciones conservativas perfiladas anteriormente (i) a (v).

El término "IL-17^{aa}" o "interleuquina 17A" (llamada anteriormente CTLA-8, y también denominada en el presente documento y en la técnica simplemente como "IL-17" o "interleuquina 17", dado que es el miembro fundador de la familia de IL17) designa una potente citoquina proinflamatoria producida por células T de memoria activadas (Gurney y Aggarwal (2002), "IL-17: prototype member of an emerging cytokine family", J. Leukoc. Biol. 71(1): 1-8). En más detalle, IL-17A es una citoquina que actúa como un potente mediador en reacciones de tipo retardado incrementando la producción de quimioquina en diversos tejidos para reclutar monocitos y neutrófilos hasta el sitio de inflamación, similar a interferón gamma. La IL-17A es producida por células T auxiliares y es inducida por IL-23, lo que da como resultado daño tisular destructivo en reacciones de tipo retardado. La interleuquina 17A como una familia funciona como citoquina proinflamatoria que responde a la invasión del sistema inmunitario por patógenos extracelulares e induce destrucción de la matriz celular del patógeno. La interleuquina 17A actúa de forma sinérgica con el factor de necrosis tumoral e interleuquina-1. La IL-17A humana es una proteína de 155 aminoácidos, que preferentemente comprende o consiste en la SEQ ID NO 10 que es una glucoproteína secretada, homodimérica, enlazada mediante disulfuro con una masa molecular de 35 kDa. Cada subunidad del homodímero es de aproximadamente 15-20 kDa. La estructura de IL-17A consiste en un péptido señal de 23 aminoácidos (aa) seguido por una región cadena de 132 aa característica de la familia IL-17. Un sitio de glucosilación enlazado a N en la proteína se identificó en primer lugar después de que la purificación de la proteína reveló dos bandas, una a 15 KDa y otra a 20 KDa. Tal como se ha mencionado, IL17 tal como se identificó inicialmente se designó IL-17A para indicar que es el miembro fundador de esta familia de citoquinas. Además de IL-17A, los miembros de la familia de IL-17 incluyen IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (también llamada IL-25) e IL-17F. Se cree que la familia de IL-17 representa un sistema de señalización distinto que parece haberse conservado altamente durante la evolución de los vertebrados. Todos los miembros de la familia de IL-17 tienen una estructura de proteína similar, con cuatro residuos de cisteína altamente conservados críticos para su forma tridimensional, aunque no tienen ninguna similitud de secuencia con ninguna otra citoquina conocida.

Los polipéptidos que inhiben IL-17A desvelados en el presente documento tienen sorprendentemente una alta especificidad y alta afinidad por IL-17A no glucosilada así como IL-17A glucosilada. En particular, las SEQ ID NO 3 a 9 de la invención son capaces de inhibir completamente IL-17A glucosilada con potencias similares en comparación con IL-17A no glucosilada (véase el ejemplo 3). Ésta es una propiedad ventajosa en comparación con los polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn que se conocen del documento WO 2011/023685. Los polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn descritos en el documento WO 2011/023685 no inhiben completamente IL-17A glucosilada incluso a concentraciones altas y/o muestran grandes diferencias en potencia de inhibición (valores de CI_{50}) entre IL-17A glucosilada y no glucosilada (véase el ejemplo 3 y la figura 3). Tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, IL-17A es secretada *in vivo* como un homodímero unido covalentemente glucosilado. Las nuevas moléculas de unión a IL-17A desveladas en el presente documento - que tienen la ventaja de unirse a e inhibir IL-17A glucosilada - son, por lo tanto, particularmente adecuadas para aplicaciones que requieren la detección o unión a IL-17A *in vivo*, donde ésta principalmente presente como una proteína glucosilada. Dichas aplicaciones son, por ejemplo, diagnóstico y tratamientos médicos, preferentemente la formulación de medicamentos para tratar y/o prevenir enfermedades mediadas por IL-17A.

Los ejemplos a continuación en el presente documento muestran que los aminoácidos enumerados para las posiciones de los aminoácidos (X^1) a (X^6) otorgan especificidad de unión a IL-17A glucosilada, en particular a la IL-17A glucosilada que tiene la SEQ ID NO: 10. En más detalle, el alineamiento de secuencia de las SEQ ID NO 3 a 9 de la invención en la figura 8 muestra que las posiciones de aminoácidos (X^1) a (X^6) se seleccionan entre (X^1) es A, K, S, D o E; (X^2) es N, Q, A, K, S o R; (X^3) es H, K, R, L o V; (X^4) es G o S; (X^5) es H, Q, A, W, V o N; y (X^6) es R, L o S en las SEQ ID NO 3 a 9. Por lo tanto, puede esperarse que también secuencias de aminoácidos seleccionadas entre (X^1) y (X^6), tal como se han definido anteriormente, diferentes de las combinaciones de aminoácidos específicas para (X^1) a (X^6) tal como están presentes en las SEQ ID NO 3 a 9 otorguen especificidad de unión a IL17A glucosilada.

En una realización preferida de la invención, las posiciones de los aminoácidos (X^1) a (X^6) del polipéptido de la invención se seleccionan, por lo tanto, entre (X^1) que es A, K, S, D o E; (X^2) que es N, Q, A, K, S o R; (X^3) que es H, K, R, L o V; (X^4) que es G o S; (X^5) que es H, Q, A, W, V o N; y (X^6) que es R, L o S (véase la SEQ ID NO: 21).

También están abarcadas por la presente invención sustituciones de aminoácidos conservativas de (X^1) que es A, K, S, D o E; (X^2) que es N, Q, A, K, S o R; (X^3) que es H, K, R, L o V; (X^4) que es G o S; (X^5) que es H, Q, A, W, V o N; y (X^6) que es R, L o S.

Se prefiere particularmente que las posiciones de los aminoácidos (X^1) a (X^6) del polipéptido de la invención se seleccionen entre (X^1) que es S o E; (X^2) que es A o S; (X^3) que es R o V; (X^4) que es G o S; (X^5) que es Q o V; y (X^6) que es L o S. Estos aminoácidos corresponden a las posiciones (X^1) a (X^6) en las SEQ ID NO 5 y 7,

respectivamente. Lo que más se prefiere es que las posiciones de los aminoácidos (X^1) a (X^6) del polipéptido de la invención sean (X^1) que es S; (X^2) que es A; (X^3) que es R; (X^4) que es G; (X^5) que es Q; y (X^6) que es L. Estos aminoácidos corresponden a las posiciones (X^1) a (X^6) en la SEQ ID NO: 5. De acuerdo con un polipéptido de acuerdo con el punto (b) del primer polipéptido, no solamente las posiciones de los aminoácidos (X^1) a (X^6) pueden diferir entre la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (o las SEQ ID NO 3 a 9), sino que también posiciones de aminoácidos adicionales que no están dentro del bucle RT y/o src (que tienen la secuencia STHEYE (SEQ ID NO: 2) de acuerdo con la invención) del dominio SH3 de la Fyn quinasa (SEQ ID NO: 20). Se cree que las diferencias de aminoácidos en estas posiciones no son esenciales para la especificidad de unión de las SEQ ID NO. 3 a 9. Por lo tanto, estas posiciones de aminoácidos pueden intercambiarse o deletionarse, o pueden añadirse aminoácidos adicionales, sin interferir sustancialmente en la especificidad de unión a IL17A glucosilada. Si se intercambian aminoácidos, se prefieren intercambios conservativos.

En una realización más preferida, el polipéptido de la invención comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO 3 a 9.

Tal como se muestra en los ejemplos a continuación en el presente documento, se descubrió que las SEQ ID NO 3 a 9 se unen a e inhiben IL-17A no glucosilada así como glucosilada que tiene la SEQ ID NO: 10. En más detalle, se descubrió sorprendentemente que los polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn de las SEQ ID NO 3 a 9 son capaces de inhibir completamente IL-17A glucosilada con potencias similares en comparación con IL-17A no glucosilada. Ésta es una propiedad ventajosa en comparación con los polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn que se describen en el documento WO 20118023685 (véanse datos comparativos en el ejemplo 3).

Entre las SEQ ID NO 3 a 9 se da preferencia a las SEQ ID NO 5 y 7. Las SEQ ID NO 5 y 7 se han usado para generar las construcciones de fusión y construcciones descritas en el presente documento en el ejemplo 4. Las construcciones de fusión y construcciones obtenidas fueran particularmente útiles, dado que son estables, monoméricas, solubles y presentan excelentes propiedades biofísicas y similares a un fármaco. Además, la fusión de las SEQ ID NO 5 y 7 a compuestos adicionales no efectuaron la excelente unión a IL-17A glucosilada.

Tal como se conoce bien, cambios secundarios en una secuencia de aminoácidos tales como delección, adición o sustitución de uno, unos pocos o incluso varios aminoácidos pueden conducir a una forma mutante de la proteína original que tiene propiedades sustancialmente idénticas. Por lo tanto, en lo que respecta a las SEQ ID NO 3 a 9 también abarcadas por la presente invención es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 85 %, preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 % y de la forma más preferida al menos el 98 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NO 3 a 9, siempre que la secuencia de aminoácidos STHEYE (SEQ ID NO: 2) en las posiciones de los aminoácidos 31 a 36 de la SEQ ID NO: 1 se conserve. Si se intercambian aminoácidos, se prefieren intercambios conservativos.

Se prefiere además, de acuerdo con la invención, que la IL-17A comprenda o consista en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10.

Tal como es evidente a partir de los ejemplos a continuación en el presente documento, la IL-17A humana que tiene la SEQ ID NO: 10 se ha usado como proteína diana a fin de identificar los polipéptidos que tienen las SEQ ID NO 3 a 9. Los primeros 23 aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 son el péptido señal. Se prefiere particularmente, por lo tanto, que el polipéptido de la invención se una a IL-17A glucosilada dentro de las posiciones de los aminoácidos 24 a 155 de la SEQ ID NO: 10.

En otra realización, la presente invención se refiere a una construcción de fusión que comprende el polipéptido de la invención fusionado a un compuesto adicional.

Una "construcción de fusión", tal como se usa en el presente documento, define la fusión del polipéptido de la invención a un compuesto adicional. El compuesto puede ser un compuesto proteínico o un compuesto no proteínico. En el caso en que el compuesto es un compuesto proteínico (por ejemplo una citoquina o quimioquina, tal como se describe a continuación en el presente documento), la construcción de fusión también puede designarse como proteína de fusión. La expresión "proteína de fusión", tal como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a una construcción polipeptídica generada a través de la unión y expresión de dos o más genes que codifican polipéptidos diferentes. En otras palabras, la traducción de este gen de fusión da como resultado un único polipéptido con propiedades funcionales derivadas de cada uno de los polipéptidos originales. Los polipéptidos pueden estar fusionados directamente o mediante un enlazador, es decir una secuencia polipeptídica corta. En general, las proteínas de fusión se generan artificialmente mediante tecnología de ADN recombinante bien conocida por el experto en la materia (por ejemplo Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4ª ed. Garland Science, p. 518-519). Sin embargo, polipéptidos y proteínas de fusión de la invención pueden prepararse mediante cualquiera de las muchas técnicas convencionales y bien conocidas, tales como estrategias sintéticas orgánicas sencillas, técnicas de síntesis en fase sólida o mediante sintetizadores automatizados disponibles en el mercado. Las proteínas de fusión pueden usarse en investigación biológica o terapéutica. Los ejemplos de compuestos no proteínicos como compuesto adicional son, por ejemplo, pequeñas moléculas orgánicas, tales como polietilenglicol (PEG) o Alexa

Fluor, o radionúclidos. Ejemplos específicos adicionales de compuestos adicionales no proteínicos se describen a continuación en el presente documento.

5 De acuerdo con una realización preferida, el compuesto adicional es un compuesto farmacéuticamente activo, un profármaco, un transportador farmacéuticamente activo, un compuesto activo desde el punto de vista del diagnóstico, un potenciador de la penetración celular y/o un compuesto que modula la semivida sérica.

10 Un compuesto farmacéuticamente activo es un compuesto que tiene una actividad biológica tras la administración a un sujeto, que provoca un efecto beneficioso para el sujeto. Un profármaco es un compuesto que se administra en una forma inactiva (o menos que totalmente activa) a un sujeto, y se convierte posteriormente en un compuesto farmacéuticamente activo o farmacéuticamente totalmente activo a través de procesos metabólicos en el sujeto. El compuesto farmacéuticamente (totalmente) activo es, preferentemente, un compuesto adecuado para el tratamiento o prevención de cualquiera de las enfermedades específicas definidas a continuación en el presente documento.

15 Un compuesto activo desde el punto de vista del diagnóstico es un compuesto que tiene una actividad tras la administración a un sujeto, lo que permite determinar o identificar una posible enfermedad o trastorno. Los ejemplos de compuestos activos desde el punto de vista del diagnóstico incluyen marcadores detectables, tales como colorantes fluorescentes, radionúclidos o agentes de contraste para imaginología médica. Ejemplos específicos de colorantes fluorescentes, radionúclidos y agentes de contraste para imaginología médica se describen a continuación en el presente documento. Un compuesto activo desde el punto de vista del diagnóstico fusionado a un polipéptido de la invención puede usarse en particular para determinar o identificar una cualquiera de las enfermedades específicas definidas a continuación en el presente documento que tienen en común que su origen y/o síntoma(s) están relacionados con IL-17A y/o Th-17. Las facetas de dicha enfermedad pueden detectarse o identificarse mediante el polipéptido de la invención fusionado al compuesto activo desde el punto de vista del diagnóstico de la invención.

Un potenciador de la penetración celular es un compuesto que facilita la administración del polipéptido de la invención en una célula (*in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*).

30 Un compuesto que modula la semivida sérica es un compuesto que permite prolongar la semivida *in vivo* de los polipéptidos de la invención, en particular en el sistema de circulación sanguínea. El componente que modula la semivida sérica es preferentemente polietilenglicol (PEG).

35 Un transportador farmacéuticamente activo es un compuesto que mejora la administración y/o la eficacia del polipéptido de la invención tras la administración a un sujeto. En la técnica se conocen bien transportadores farmacéuticamente activos adecuados, e incluyen, por ejemplo, estabilizantes, antioxidantes, sustancias reguladoras del pH, etc.

40 De acuerdo con otra realización preferida, el compuesto adicional de la invención se selecciona entre el grupo que consiste en (a) un colorante fluorescente, (b) un fotosensibilizador, (c) un radionúclido, (d) un agente de contraste para imaginología médica, (e) una citoquina, (f) un compuesto tóxico, (g) una quimioquina, (h) un factor procoagulante, (i) una enzima para activación de profármacos, (k) un aglutinante de albúmina, (l) una albúmina, (m) un aglutinante de IgG o (n) polietilenglicol.

45 El colorante fluorescente es, preferentemente, un componente seleccionado entre colorantes Alexa Fluor o Cy.

El fotosensibilizador es, preferentemente, la proteína fluorescente roja fototóxica KillerRed o hematoporfirina.

50 El radionúclido se selecciona, preferentemente, entre el grupo de isótopos que emiten radiación gamma, más preferentemente ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{111}In , y/o entre el grupo de emisores de positrones, más preferentemente ^{18}F , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{124}I , y/o entre el grupo de emisores beta, más preferentemente ^{131}I , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{67}Cu , o entre el grupo de emisores alfa, preferentemente ^{213}Bi , ^{211}At .

55 Un agente de contraste, tal como se usa en el presente documento, es una sustancia usada para mejorar el contraste de estructuras o fluidos dentro del cuerpo en imaginología médica. Los agentes de contraste comunes funcionan basándose en la atenuación de rayos X y la intensificación de la señal de resonancia magnética.

60 La citoquina se selecciona, preferentemente, entre el grupo que consiste en IL-2, IL-12, TNF-alfa, IFN alfa, IFN beta, IFN gamma, IL-10, IL-15, IL-24, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-13, LIF, CD80, B70, TNF beta, LT-beta, ligando CD-40, ligando Fas, TGF-beta, IL-1alfa e IL-1beta. Tal como se conoce bien en la técnica, las citoquinas pueden favorecer una respuesta proinflamatoria o antiinflamatoria del sistema inmunitario. Por lo tanto, dependiendo de la enfermedad a tratar, pueden favorecerse construcciones de fusión con una citoquina proinflamatoria o una antiinflamatoria. Por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, en general se prefieren construcciones de fusión que comprenden citoquinas antiinflamatorias, mientras que, para el tratamiento de cáncer en general, se prefieren construcciones de fusión que comprenden citoquinas proinflamatorias.

65

El compuesto tóxico es, preferentemente, un pequeño compuesto orgánico o un polipéptido, más preferentemente un compuesto tóxico seleccionado entre el grupo que consiste en caliqueamicina, maitansinoide, neocarzinostatina, esperamicina, dinemicina, kedarcidina, maduropeptina, doxorubicina, daunorrubicina, auristatina, cadena A de ricina, modeccina, exotoxina A de *Pseudomonas truncada*, toxina de difteria y gelonina recombinante.

La quimioquina se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en IL-8, GRO alfa, GRO beta, GRO gamma, ENA-78, LDGF-PBP, GCP-2, PF4, Mig, IP-10, SDF-1 alfa/beta, BUNZO/STRC33, I-TAC, BLC/BCA-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, MDC, TECK, TARC, RANTES, HCC-1, HCC-4, DC-CK1, MIP-3 alfa, MIP-3 beta, MCP-1-5, eotaxina, Eotaxina-2, I-309, MIPF-1, 6Cquina, CTACK, MEC, linfotacina y fractalquina.

El factor procoagulante es, preferentemente, el factor tisular (TF) o procoagulante del cáncer (CP).

La enzima para activación de profármacos es, preferentemente, una enzima seleccionada del grupo que consiste en carboxi-peptidasas, glucuronidasas y glucosidasas.

Los ejemplos de un aglutinante de albúmina, y un aglutinante de IgG se describen en Gebauer y Skerra (2009), 13: 245-255. Por consiguiente, ejemplos preferidos de aglutinantes de albúmina y aglutinantes de IgG son dominios de Ig sencillos humanos (albúmina doblada Dab), nanocuerpos, dominio de unión a albúmina (ABD) de origen natural derivado de la proteína G estreptocócica, y un dominio que se une a IgG. Dichas construcciones de fusión, por ejemplo, incrementan la semivida del polipéptido de la invención tras la administración a un paciente, en particular en el sistema circulatorio sanguíneo.

De acuerdo con otra realización preferida, el compuesto adicional de la invención consiste en o comprende una cadena ligera de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, un dominio F_c de un anticuerpo, un anticuerpo, o una combinación de los mismos.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos de cadena sencilla, o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a dicho péptido o polipéptido, que también incluyen anticuerpos biespecíficos, anticuerpos sintéticos, fragmentos de anticuerpo diferentes de cadenas pesada y ligera, tales como fragmentos Fab, F(ab₂), Fv o scFv etc., o un derivado modificado químicamente de cualquiera de estos. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales, por ejemplo, mediante las técnicas tal como se han descrito originalmente en Köhler y Milstein, *Nature* 256 (1975), 495, y Galfré, *Meth. Enzymol.* 73 (1981), 3, que comprenden la fusión de células de mieloma de ratón con células esplénicas derivadas de mamíferos inmunizados con modificaciones desarrolladas por la técnica. Además, anticuerpos o fragmentos de los mismos para los péptidos mencionados anteriormente pueden obtenerse usando métodos que se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual". Cuando se obtienen derivados de dichos anticuerpos mediante la técnica de presentación en fagos, puede usarse resonancia del plasmón superficial, tal como se emplea en el sistema BIAcore, para incrementar la eficacia de anticuerpos de fago que se unen a un epítipo del péptido o polipéptido de la invención (Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmborg, *J. Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13). La producción de anticuerpos quiméricos se describe, por ejemplo, en el documento WO89/09622. Una fuente de anticuerpos adicional que se utilizará de acuerdo con la presente invención son los llamados anticuerpos xenogénicos. El principio general para la producción de anticuerpos xenogénicos tales como anticuerpos humanos en ratones se describe, por ejemplo, en los documentos WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 y WO 96/33735. Los anticuerpos a emplear de acuerdo con la invención o sus cadenas de inmunoglobulina correspondientes pueden modificarse adicionalmente usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, usando delecciones, inserciones, sustituciones, adiciones y/o recombinaciones y/o cualesquiera otras modificaciones de aminoácidos conocidas en la técnica, en solitario o en combinación. Métodos para introducir dichas modificaciones en la secuencia de ADN subyacente a la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina son bien conocidos por el experto en la materia; véase, por ejemplo, Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

El término "monoclonal" o "anticuerpo policlonal" (véase Harlow y Lane, (1988), *loc. cit.*) también se refiere a derivados de dichos anticuerpos que conservan o conservan esencialmente su especificidad de unión. Mientras que realizaciones particularmente preferidas de dichos derivados se especifican adicionalmente a continuación en el presente documento, otros derivados preferidos de dichos anticuerpos son anticuerpos quiméricos que comprenden, por ejemplo, una región variable de ratón o rata y una región constante de ser humano.

La expresión "fragmento scFv" (fragmento Fv de cadena sencilla) se entiende bien en la técnica y se prefiere debido a su pequeño tamaño y la posibilidad de producir de forma recombinante dichos fragmentos.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado. La expresión "anticuerpo humanizado" significa, de acuerdo con la presente invención, un anticuerpo de origen no humano, cuya secuencia de proteínas ha sido modificada para incrementar su similitud con variantes de anticuerpo producidas de forma natural en seres humanos. La creación de un anticuerpo humanizado puede conseguirse, por ejemplo, insertando los segmentos codificantes de CDR apropiados (responsables de las propiedades de unión deseadas), tales como CDR 3 y, preferentemente, los 6

CDR, en una “matriz de soporte” de anticuerpos humanos. Los métodos para la producción de anticuerpos humanizados se describen, por ejemplo, en los documentos EP-A1 0 239 400 y WO 90/07861.

La expresión “cadena ligera de anticuerpo” designa la subunidad polipeptídica pequeña de un anticuerpo, mientras que la expresión “cadena pesada de anticuerpo” designa la subunidad polipeptídica grande de un anticuerpo. Un anticuerpo típico está compuesto por dos cadenas pesadas de inmunoglobulina (Ig) y dos cadenas ligeras de Ig. Cada cadena ligera está compuesta por dos dominios de inmunoglobulina en tándem; un dominio constante (C_L) y un dominio variable (V_L) que es importante para unión al antígeno. La cadena pesada determina la clase o el isotipo de un anticuerpo. Cada cadena pesada tiene dos regiones, concretamente una región constante (que es la misma para todas las inmunoglobulinas de la misma clase pero difiere entre clases) y una región variable que difiere entre diferentes células B, pero es la misma para todas las inmunoglobulinas producidas por la misma célula B o clon de célula B. El dominio variable de cualquier cadena pesada está compuesto por un único dominio de inmunoglobulina.

Un “dominio de Fc funcional” de un anticuerpo es una expresión bien conocida por el experto en la materia y se define tomando como base la escisión de anticuerpos con papaína. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se dividen en las clases: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. De acuerdo con las regiones constantes de cadena pesada, las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan [alfa], [delta], [épsilon], [gamma], y [mu], respectivamente. El dominio de Fc funcional de un anticuerpo está implicado directamente en ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo) y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) basándose en activación del complemento, unión a C1q y unión al receptor de Fc. Los cuatro isotipos de IgG humana se unen a diferentes receptores, tales como el receptor de Fc neonatal, los receptores gamma de Fc activadores, $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIa$ y $Fc\gamma RIIIa$, el receptor inhibidor $Fc\gamma RIIB$, y C1q con diferentes afinidades, produciendo actividades muy diferentes. Es conocido que las afinidades a receptores de activación e inhibición de un dominio Fc de un anticuerpo humano puede genomanipularse y modificarse (véase Strohl W. (2009) Curr Opin Biotechnol, 20, p. 685-691).

Preferentemente, el dominio Fc es uno o más dominios de Fc funcionales humanos que permiten prolongar la semivida *in vivo* de los polipéptidos de la invención y algunos de los cuales dirigen la respuesta inmunitaria de un mamífero a un sitio de unión a la diana específico del componente polipeptídico de la invención de la proteína de fusión, por ejemplo en aplicaciones terapéuticas, profilácticas y/o de diagnóstico tal como se describe a continuación en el presente documento. Más preferentemente, dicho dominio de Fc funcional humano es de un anticuerpo IgG1. Los polipéptidos de la invención pueden fusionarse al extremo N o C de uno o más dominios de Fc funcionales o tanto al extremo N como al C de uno o más dominios Fc. Se prefiere que las proteínas de fusión de la invención comprendan multímeros, preferentemente tetrámeros, trímeros o, de la forma más preferente, dímeros de los polipéptidos de la invención fusionados a al menos un lado, preferentemente al extremo N de uno o más, preferentemente un dominio Fc.

En una realización más preferida de la presente invención, el dominio Fc es uno o más dominios de Fc funcionales humanos genomanipulados de una IgG1 con funciones activación o efectoras de silenciadas, preferentemente uno o más dominios de Fc funcionales humanos genomanipulados de una IgG1 con funciones efectoras silenciadas, y aún más preferentemente uno o más dominios de Fc funcionales humanos genomanipulados de una IgG1 con funciones efectoras silenciadas con una mutación en L234 y L235, numeración de acuerdo con el índice EU de Kabat (véase Johnson G. y Wu T.T. (2000) Nucleic Acids Res. 28, p. 214-218), y de la forma más preferida con la mutación L234A y L235A.

El anticuerpo en la construcción de fusión de la invención preferentemente se une específicamente a $TNF\alpha$. La expresión “se une específicamente a” se refiere a aquellos casos donde $TNF\alpha$ está unido con la constante de equilibrio de unión K_D que es un factor 2 más pequeña, preferentemente un factor 5 o un factor 10 más a en comparación con la constante de equilibrio de unión observadas para la unión de la construcción de fusión de la invención a una proteína no relacionada, no siendo dicha proteína no relacionada un miembro de la familia de TNF o siendo un miembro diferente de la familia de TNF tal como $TNF\beta$.

De acuerdo con otra realización preferida de la construcción de fusión de la invención, el polipéptido de la invención está ubicado cadena abajo del extremo C de dicho compuesto adicional que consiste en o que comprende una cadena ligera de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, un dominio Fc de un anticuerpo, un anticuerpo o una combinación de los mismos.

Dicho compuesto adicional puede estar fusionado directamente al polipéptido o mediante un enlazador. Por consiguiente, la construcción de fusión puede estar fusionada (directamente) al extremo C del compuesto adicional, más específicamente mediante la formación de un enlace peptídico entre el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal y el grupo amino del aminoácido N-terminal, o puede estar conectada al extremo C de la cadena del compuesto adicional mediante un enlazador.

Los enlazadores adecuados están a disposición del experto en la materia. El enlazador de acuerdo con la invención se selecciona, preferentemente, entre el grupo que consiste en alquilo con de 1 a 30 átomos de carbono,

polietilenglicol con de 1 a 20 fracciones de etileno, polialanina con de 1 a 20 residuos, ácido caproico, poli-p-fenileno y triazol sustituidos y sin sustituir. También se da preferencia a enlazadores peptídicos, más específicamente a oligopéptidos que tienen una longitud de 2 a 30 aminoácidos. El uso de un único aminoácido también está previsto deliberadamente. Los intervalos de longitud preferidos son de 5 a 15 aminoácidos. Otras longitudes preferidas son 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos.

Se prefieren particularmente enlazadores que son péptidos que consisten en al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 % de pequeños aminoácidos tales como glicina, serina y alanina. Se prefieren particularmente enlazadores que consisten en glicinas y serinas solamente. Los que más se prefieren son los enlazadores de las SEQ ID NO: 13 a 15 con preferencia especial dada a un enlazador que es un péptido que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 15.

De acuerdo con otra realización preferida de la construcción de fusión de la invención, el compuesto adicional comprende o consiste en una cadena ligera de anticuerpo que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 11.

La SEQ ID NO: 11 es la cadena ligera de un anticuerpo anti-TNF α . Debe entenderse que también la SEQ ID NO: 11 puede fusionarse directamente al polipéptido de la invención o mediante un enlazador. Por consiguiente, la construcción de fusión puede fusionarse (directamente) al extremo C del compuesto adicional, más específicamente mediante la formación de un enlace peptídico entre el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal y el grupo amino del aminoácido N-terminal, o puede conectarse al extremo C de la cadena del compuesto adicional mediante un enlazador. Los enlazadores preferidos comprenden o consisten en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 13 a 15, en el que la SEQ ID NO: 15 es la más preferida. Los ejemplos particularmente preferidos de la construcción de fusión de acuerdo con esta realización comprenden o consisten en las SEQ ID NO 16 o 17, en las que la SEQ ID NO: 16 es la más preferida.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a una construcción que comprende o que consiste en al menos una copia, preferentemente dos copias, de la construcción de fusión que comprende o que consiste en una cadena ligera de anticuerpo que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 11 y al menos una copia, preferentemente dos copias, de la cadena pesada de anticuerpo de la SEQ ID NO: 12.

La SEQ ID NO: 12 es la cadena pesada de un anticuerpo anti-TNF α . Por lo tanto, la construcción de acuerdo con esta realización al menos comprende el polipéptido que se une a IL-17A glucosilada de la invención, la cadena ligera de un anticuerpo anti-TNF α (SEQ ID NO: 11) y la cadena pesada de un anticuerpo anti-TNF α (SEQ ID NO: 12), en el que el polipéptido que se une a IL-17A de la invención y la cadena ligera de un anticuerpo anti-TNF α forman la fusión. Se prefiere que el número de copias de la cadena ligera y la pesada en la construcción de la invención sea el mismo. El componente de cadena ligera del anticuerpo, cuando se junta con el componente de cadena pesada del anticuerpo, permite la formación de un sitio de unión al antígeno, sitio que reconoce TNF α . En el caso de que la construcción comprenda cada dos copias de la cadena ligera de un anticuerpo anti-TNF α (SEQ ID NO: 11) y la cadena pesada de un anticuerpo anti-TNF α (SEQ ID NO: 12), la construcción preferentemente comprende un anticuerpo anti-TNF α completo, en el que cada cadena ligera de dicho anticuerpo está fusionada directamente o fusionada mediante un enlazador al polipéptido de la invención. Ejemplos preferidos de dichas construcciones se describen en el ejemplo 4 y se muestran en la tabla 4 a continuación en el presente documento.

De acuerdo con una realización preferida, la presente invención se refiere a una construcción que comprende o que consiste en al menos una copia, preferentemente dos copias de la construcción de fusión que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 16 o 17 (en la que se prefiere SEQ ID NO: 16) y al menos una copia, preferentemente dos copias de la cadena pesada de anticuerpo de la SEQ ID NO: 12.

Se prefiere que esta construcción comprenda o consista en dos copias de la construcción de fusión que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 16 o 17 (en la que se prefiere la SEQ ID NO: 16) y dos copias de la cadena pesada de anticuerpo of SEQ ID NO: 12. Dicha construcción puede comprender, por lo tanto, un anticuerpo anti-TNF α completo.

Dentro de la construcción de la invención, se prefiere que el polipéptido de la invención esté ubicado cadena abajo del extremo C de la cadena ligera que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 11.

La construcción de la invención es capaz de unirse de forma concomitante a dos moléculas diana, concretamente interleuquina-17A glucosilada por un lado y TNF α por otro lado. La construcción comprende un sitio de unión a IL-17A glucosilada funcional debido a la presencia del polipéptido de la invención.

La construcción de acuerdo con la presente invención puede obtenerse juntando, en condiciones adecuadas, dicha proteína de fusión y dicha cadena pesada de anticuerpo. El experto en la materia está al tanto de condiciones adecuadas. Dicha unión en condiciones adecuadas permite el ensamblaje no covalente desencadenado por las interacciones entre la cadena ligera de anticuerpo tal como está comprendida en dicha proteína de fusión y dicha cadena pesada de anticuerpo. Preferentemente, puentes disulfuro tal como se encuentran habitualmente en

anticuerpos están presentes en la construcción de la invención. Los puentes disulfuro están normalmente presentes en las inmediaciones de la región bisagra y conectan dos cadenas pesadas y/o una cadena ligera y una cadena pesada.

5 La presente invención se refiere, además, a una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la invención, o la construcción de fusión de la invención, o una o más moléculas de ácido nucleico que codifican la construcción de la invención.

10 Las una o más moléculas de ácido nucleico que codifican la construcción de la invención pueden ser, por ejemplo, dos moléculas de ácido nucleico en las que una molécula de ácido nucleico codifica la construcción de fusión de la invención y la otra molécula de ácido nucleico la cadena pesada de un anticuerpo.

15 Las moléculas de ácido nucleico, de acuerdo con la presente invención, incluyen ADN, tal como ADNc, y ARNm. También se incluyen moléculas que imitan a ácidos nucleicos conocidas en la técnica tales como derivados sintéticos o semisintéticos de ADN o ARN y polímero mixtos, con cadenas tanto en sentido como antisentido. Éstas pueden contener bases de nucleótidos no naturales o derivatizadas adicionales, tal como apreciarán fácilmente los expertos en la materia. En una realización preferida, el polinucleótido o la molécula o moléculas de ácido nucleico es/son ADN. Dichas moléculas que imitan a ácidos nucleicos o derivados de ácido nucleico de acuerdo con la invención incluyen ácido fosforotioato nucleico, ácido fosforamido nucleico, ácido 2'-O-metoxietil ribonucleico, ácido morfolino nucleico, ácido hexitol nucleico (AHN) y ácido nucleico bloqueado (ANB) (véase, por ejemplo, Braasch y Corey, Chemistry & Biology 8, 1-7 (2001)). El ANB es un derivado de ARN en el que el anillo de ribosa está constreñido por un enlace metileno entre el oxígeno 2' y el carbono 4'.

25 Para los fines de la presente invención, un ácido péptido nucleico (APN) es un tipo de poliamida de análogo de ADN. Las unidades monoméricas para los derivados correspondientes de adenina, guanina, timina y citosina están disponibles en el mercado (por ejemplo de Perceptive Biosystems). El APN es un imitador de ADN sintético con una cadena principal de amida en lugar de la cadena principal de azúcar-fosfato de ADN o ARN. Como consecuencia, ciertos componentes del ADN, tales como fósforo, óxidos de fósforo o derivados de desoxirribosa, no están presentes en los APN.

30 Quimeras de APN de acuerdo con la presente invención son moléculas que comprenden una o más partes de APN. El resto de la molécula quimérica puede comprender una o más partes de ADN (quimera de APN-ADN) o una o más partes de (poli)péptido (quimera péptido-APN). Las quimeras péptido-DNA de acuerdo con la invención son moléculas que comprenden una o más partes de (poli)péptido y una o más partes de ADN. También están previstas moléculas que comprenden partes de APN, péptido y ADN. La longitud de una parte de una molécula quimérica puede variar entre 1 y n-1 bases, equivalentes de las mismas o aminoácidos, en las que "n" es el número total de bases, equivalentes de las mismas y aminoácidos de toda la molécula.

40 El término "derivados" junto con los APN, (poli)péptidos, quimera de APN y quimera de péptido-ADN descritos anteriormente se refiere a moléculas en las que estas moléculas comprenden uno o más grupos o sustituyentes adicionales diferentes de APN, (poli)péptidos y ADN. Todos los grupos o sustituyentes conocidos en la técnica y usados para la síntesis de estas moléculas, tales como grupos de protección y/o para aplicaciones que implican estas moléculas, tales como marcas y enlazadores (escindibles) están previstos.

45 En aquellas realizaciones en las que la molécula de ácido nucleico comprende (en lugar de tener) la secuencia mencionada, nucleótidos adicionales se extienden sobre la secuencia específica en el extremo 5' o el extremo 3' o ambos. Esas secuencias adicionales pueden ser de naturaleza heteróloga u homóloga y pueden comprender tramos de aproximadamente 50 a 500 nucleótidos aunque valores mayores o menores no están excluidos. En el caso de secuencias homólogas, esas realizaciones no incluyen genomas completos y están confinadas generalmente a aproximadamente 1500 nucleótidos adicionales en el extremo 5' y/o 3'.

50 Secuencias heterólogas adicionales pueden incluir promotores heterólogos que están enlazados de forma operativa a las secuencias codificantes de moléculas anteriores. Por lo tanto, preferentemente, la molécula de ácido nucleico está enlazada de forma operativa a un promotor, y más preferentemente enlazada a un promotor seleccionado entre el grupo de promotores procariotas que consisten en el elemento promotor T5/operador lac, elemento promotor T7/operador lac, o entre el grupo de promotores eucariotas que consiste en el promotor hEF1-HTLV, CMV enh/hFerL.

60 La presente invención también se refiere a uno o más vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico de la invención, así como una o más células huésped que comprenden las una o más moléculas de ácido nucleico de la invención o los uno o más vectores de la invención.

65 Los vectores y las células aisladas, en particular, células huésped, pueden ser de cualquier tipo convencional que se ajuste al fin, por ejemplo, producción de polipéptidos, construcciones de fusión y/o construcciones de la invención, y/o vectores y células huésped, terapéuticamente útiles, por ejemplo, para terapia génica. El experto en la materia será capaz de seleccionar aquellas moléculas de ácido nucleico, vectores y células huésped entre una técnica

anterior abundante y confirmar su particular idoneidad para el fin deseado mediante métodos rutinarios y sin carga excesiva.

5 También se prefiere que los uno o más vectores de la invención comprendan uno o más ácidos nucleicos de la invención y sean, preferentemente, capaces de producir un polipéptido o proteína de fusión de la invención. Preferentemente, dichos vectores se seleccionan entre el grupo que consiste en vectores pQE, vectores pET, vectores pFUSE, vectores pUC, vectores YAC, vectores de fagémido, vectores de fago, vectores usados para terapia génica tales como retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados. Para técnicas de modificación de vectores, véase Sambrook y Russel (2001), *loc. cit.* En general, los vectores pueden contener uno o más orígenes de replicación (ori) y sistemas de herencia para clonación o expresión, uno o más marcadores para selección en el huésped, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y una o más casetes de expresión. Los orígenes de replicación (ori) adecuados incluyen, por ejemplo, los orígenes de replicación Col E1, SV40 viral y M 13.

15 Las una o más moléculas de ácido nucleico de la presente invención también pueden insertarse en uno o más vectores, de modo que se genere una fusión traduccional con otra molécula de ácido nucleico. La otra molécula de ácido nucleico preferentemente codifica la cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo anti-TNF α y/o un enlazador, ejemplos preferidos de los cuales se han descrito anteriormente en el presente documento.

20 Las una o más células huésped pueden producirse introduciendo las una o más moléculas de ácido nucleico o uno o más vectores de la invención en las una o más células huésped que, tras su presencia, media en la expresión de los polipéptidos codificados por dichas moléculas de ácido nucleico o vectores. Las células huésped son preferentemente células huésped aisladas, lo que significa que las células no están dentro del contexto de un organismo vivo. El huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Un huésped eucariota adecuado puede ser una célula de mamífero, una célula de anfibio, una célula de pez, una célula de insecto, una célula fúngica o una célula vegetal. Una célula eucariota puede ser una célula de insecto tal como una célula de *Spodoptera frugiperda*, una célula de levadura tal como una célula de *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*, una célula fúngica tal como una célula de *Aspergillus* o una célula de vertebrado. A este último respecto, se prefiere que la célula sea una célula de mamífero tal como una célula humana. La célula puede ser parte de una línea celular.

30 Procariotas/bacterias adecuadas son aquellas que se usan generalmente para clonación como *E. coli* (por ejemplo, las cepas de *E. coli* HB101, DH5a, XL1 Blue, Y1090 y JM101), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia glumae*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Streptomyces lividans*, *Lactococcus lactis*, *Mycobacterium smegmatis* o *Bacillus subtilis*. Un ejemplo preferido para una célula huésped que será manipulada genéticamente con la molécula de ácido nucleico o vector de la invención es *E. coli*.

35 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende el polipéptido de la invención, la construcción de fusión de la invención, la construcción de la invención, una o más moléculas de ácido nucleico de la invención, uno o más vectores de la invención, una o más células huésped de la invención, o cualquier combinación de los mismos.

40 Tal como se ha descrito en más detalle anteriormente en el presente documento, IL-17A está implicada en muchas enfermedades. Por consiguiente, el polipéptido, construcción de fusión, construcción, moléculas de ácido nucleico, vectores, células huésped de la invención o cualquier combinación de los mismos son útiles como medicamento. Se prefiere que, dentro de dicha composición farmacéutica, el polipéptido, construcción de fusión, construcción, moléculas de ácido nucleico, vectores, células huésped de la invención o cualquier combinación de los mismos sean el único agente activo. La composición farmacéutica se administra, preferentemente, a mamíferos tales como animales domésticos y de compañía. De la forma más preferida, se administra a seres humanos. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se administrarán al sujeto a una dosis adecuada.

50 La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención, puede formularse de manera convencional de acuerdo con métodos descubiertos en la técnica, usando uno o más transportadores o excipientes fisiológicos, véase, por ejemplo, Ansel et al., "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", 7ª edición, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1999. Por consiguiente, la composición farmacéutica puede administrarse por vía oral, por vía parenteral, tal como por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intratecal, por vía transdérmica, por vía transmucosal, por vía subdural, local o tópica mediante iontoforesis, por vía sublingual, mediante pulverización para inhalación, aerosol o por vía rectal y similares, en formulaciones de dosis unitaria que opcionalmente comprenden excipientes convencionales farmacéuticamente aceptables. También pueden fabricarse composiciones de diagnóstico de la invención de cualquier manera convencional.

60 La composición farmacéutica de la invención puede administrarse como el único principio activo o junto con, por ejemplo, como un adyuvante o en combinación con otros fármacos, por ejemplo, agentes inmunosupresores o inmunomoduladores u otros agentes antiinflamatorios, por ejemplo, para el tratamiento o la prevención de las enfermedades mencionadas anteriormente. Por ejemplo, los polipéptidos, construcciones de fusión y construcciones de la invención, pueden usarse en combinación con anticuerpos monoclonales inmunosupresores, por ejemplo, anticuerpos monoclonales con afinidad por receptores de leucocitos, por ejemplo MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8,

CD25, CD28, CD40, CD45, CD58, CD80, CD86 o sus ligandos; otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo una molécula de unión recombinante que tiene al menos una parte del dominio extracelular de CTLA4 o un mutante del mismo, por ejemplo al menos una parte extracelular de CTLA4 o un mutante de la misma unida a una secuencia de proteína no CTLA4, por ejemplo CTLA4Ig (por ejemplo designada ATCC 68629) o un mutante de la misma, por ejemplo LEA29Y; inhibidores de molécula de adhesión, por ejemplo antagonistas de LFA-I, antagonistas de ICAM-1 o -3, antagonistas de VCAM-4 o antagonistas de VLA-4. Además, los polipéptidos, construcciones de fusión y construcciones de la invención pueden usarse en combinación con DMARD (fármacos antirreumáticos que modifican la enfermedad), sales de oro, sulfasalazina, antimetabólicos, metotrexato, D-penicilamina, azatioprina, ácido micofenólico, ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus, minociclina, leflunomida, glucocorticoides; un inhibidor de calcineurina, por ejemplo ciclosporina A o FK 506; un modulador de la recirculación de los linfocitos, por ejemplo, análogos de FTY720 y FTY720; un inhibidor de mTOR, por ejemplo rapamicina, 40-O-(2-hidroxiethyl)-rapamicina, CCI779, ABT578, AP23573 o Tafa-93; una ascomicina que tiene propiedades inmunosupresoras, por ejemplo ABT-281, ASM981, etc.; corticosteroides; ciclofosfamida; azatiopreno; metotrexato; leflunomida; mizoribina; ácido micofenólico; mofetil micofenolato; 15-desoxiespergualina o un homólogo inmunosupresor, análogo o derivado de la misma; o un agente quimioterapéutico, por ejemplo paclitaxel, gemcitabina, cisplatino, doxorubicina o 5-fluorouracilo; (otros) agentes anti-TNF α , por ejemplo, anticuerpos monoclonales para TNF α (que comprenden preferentemente SEQ ID NO 11 y/o 12), por ejemplo, infliximab, adalimumab, CDP870, o construcciones de receptores para TNF-RI o TNF-RII, por ejemplo, Etanercept, PEG-TNF-RI; bloqueantes de citoquinas proinflamatorias, bloqueantes de IL-1, por ejemplo, Anakinra o trampa de IL-1, AAL160, ACZ 885, bloqueantes de IL-6; inhibidores o activadores de proteasas, por ejemplo, metaloproteasas, anticuerpos anti-IL-15, anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos anti-IL-23, anticuerpos anti-IL-22, anticuerpos anti-IL-21, anticuerpos anti-IL-12, anticuerpos anti-IFN-gamma, anticuerpos anti-IFN-alfa, anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-IL-17, anticuerpos anti-IgG, AINE, como aspirina o un agente antiinfeccioso. Otros fármacos adecuados pueden incluir un inhibidor de ACE, un inhibidor de renina, un inhibidor de ADH, un inhibidor de aldosterona y un bloqueante del receptor de angiotensina. Naturalmente, esta lista de agentes de coadministración no es limitante ni completa.

En términos generales, la composición farmacéutica de la invención se usa en el tratamiento o prevención de una enfermedad mediada por IL-17A.

Las composiciones farmacéuticas de la invención preferentemente comprenden un transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Por "transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable" se entiende una carga, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación sólido, semisólido o líquido no tóxico, de cualquier tipo. Los ejemplos de transportadores o excipientes farmacéuticamente aceptables se describen, por ejemplo, en Ansel et al., "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", 7ª edición, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1999.

La composición de diagnóstico de la invención es útil en la detección de un nivel fisiológico de IL17A glucosilada no deseado, en particular IL17A glucosilada de la SEQ ID NO: 10, por ejemplo en diferentes células, tejidos u otra muestra adecuada. Dicha detección normalmente comprende poner en contacto una muestra con el polipéptido, construcción de fusión, construcción, molécula de ácido nucleico, vector, célula huésped de la invención o cualquier combinación de los mismos, y detectar la presencia de una IL17A glucosilada, en particular la IL17A glucosilada de la SEQ ID NO: 10 en la muestra. Por consiguiente, la composición de diagnóstico de la invención puede usarse para evaluar el inicio de la patología y, en particular, una patología que se define adicionalmente a continuación en el presente documento.

En una realización de la presente invención descrita anteriormente en el presente documento, el polipéptido de la invención está enlazado a un colorante fluorescente, un fotosensibilizador, un radionúclido, o un agente de contraste para imagenología médica. Dichas construcciones de fusión son particularmente adecuadas para aplicaciones de diagnóstico.

La composición de diagnóstico de la invención puede administrarse como agente activo único o puede administrarse en combinación con otros agentes, si la composición de diagnóstico se usa, por ejemplo, para identificar sitios de niveles fisiológicos de IL17A glucosilada no deseados dentro de un sujeto. En términos generales, la composición de diagnóstico de la invención se usa en el diagnóstico de una enfermedad mediada por IL-17A.

La dosis de las composiciones de diagnóstico y farmacéuticas de la invención, variará, por supuesto, dependiendo del polipéptido, construcción de fusión, construcción, una o más moléculas de ácido nucleico, uno o más vectores, una o más células huésped de la invención o cualquier combinación particular de los mismos, el grupo de pacientes o paciente individual, la presencia opcional de compuestos activos médicamente o desde el punto de vista del diagnóstico y la naturaleza y gravedad de la enfermedad a diagnosticar o tratar. Sin embargo, actualmente se prefiere que la composición de diagnóstico o farmacéutica se use en dosis de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 20 mg por kilogramo de peso corporal, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 mg por kilogramo de peso corporal. Las composiciones de diagnóstico o farmacéuticas pueden administrarse más de una vez, por ejemplo para monitorizar la evolución de una enfermedad en caso de composición de diagnóstico o para prolongar el tratamiento en caso de una composición farmacéutica. Preferentemente, la frecuencia de administración de la composición de diagnóstico o farmacéutica está en el

intervalo de diariamente hasta aproximadamente una vez cada 3 meses, de forma preferente aproximadamente una vez cada 2 semanas hasta aproximadamente una vez cada 10 semanas, más preferentemente una vez cada 4 a 8 semanas. Un régimen posológico preferido implica la administración de las composiciones de diagnóstico o farmacéuticas de la invención de una vez al mes a una vez cada 2 a 3 meses o con menos frecuencia.

5 En una realización preferida de la invención, dicha composición farmacéutica es para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad inflamatoria, autoinmunitaria y/o relacionada con la pérdida ósea.

10 En una realización más preferida de la invención, la enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en artritis, preferentemente artritis reumatoide, artritis crónica progresiva, artritis reactiva, artritis soriasica, artritis enteropática y artritis deformante, enfermedades reumáticas, espondiloartropatías, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, hipersensibilidad (incluyendo tanto hipersensibilidad de las vías respiratorias como hipersensibilidad dérmica), alergias, lupus eritematoso sistémico, trastornos musculares inflamatorios, policondritis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, dermatomiositis, síndrome de Steven-Johnson, hepatitis activa crónica, miastenia

15 granulosomatosis de Wegener, dermatomiositis, síndrome de Steven-Johnson, hepatitis activa crónica, miastenia grave, psoriasis, esprue idiopático, enfermedad intestinal inflamatoria autoinmunitaria, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, síndrome de intestino irritable, oftalmopatía endocrina, enfermedad de Graves, sarcoidosis, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, diabetes juvenil (diabetes mellitus tipo I), trastornos hematológicos autoinmunes, anemia hemolítica, anemia aplásica, anemia pura de glóbulos rojos, trombocitopenia idiopática, uveitis (anterior y posterior), queratoconjuntivitis seca, queratoconjuntivitis vernal, fibrosis pulmonar intersticial, glomerulonefritis (con y sin síndrome nefrótico), síndrome nefrótico idiopático o nefropatía de cambios mínimos, tumores, enfermedad

20 inflamatoria de la piel, inflamación de la córnea, miositis, alojamiento de implantes óseos, trastornos metabólicos, aterosclerosis, diabetes y dislipidemia, pérdida ósea, artrosis, osteoporosis, enfermedad periodontal, enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias, asma, bronquitis, neumoconiosis, enfisema pulmonar, reacciones inflamatorias agudas e hiperagudas, infecciones agudas, choque séptico, choque endotóxico, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, meningitis, neumonía, quemaduras graves, síndrome debilitante de caquexia, ictus, queratitis estromal herpética y enfermedad del ojo seco.

25 Todas las enfermedades especificadas anteriormente tienen en común que su origen y/o síntomas están relacionados con IL-17A y/o Th-17.

30 Las figuras muestran

La figura 1 muestra cromatogramas de exclusión molecular (SEC) de polipéptidos de unión a IL-17A de la invención: (A) 1L3-B09 (SEQ ID NO: 3), (B) 11L0-C6 (SEQ ID NO: 4), (C) 11L5-B06 (SEQ ID NO: 5), (D) 11L6-F03 (SEQ ID NO: 6), (E) 11L9-C09 (SEQ ID NO: 7), (F) 11L10-A05 (SEQ ID NO: 8), (G) 11L11-A09 (SEQ ID NO: 9).

35

La figura 2 representa los resultados de la inhibición *in vitro* dependiente de la dosis de IL-17A glucosilada y no glucosilada mediante polipéptidos de la invención derivados de SH3 de Fyn. A) 1L3-B09 (SEQ ID NO: 3), (B) 11L0-C6 (SEQ ID NO: 4), (C) 11L5-B06 (SEQ ID NO: 5), (D) 11L6-F03 (SEQ ID NO: 6), (E) 11L9-C09 (SEQ ID NO: 7), (F) 11L10-A05 (SEQ ID NO: 8)

40

La figura 3 representa los resultados de la inhibición *in vitro* dependiente de la dosis de IL-17A glucosilada y no glucosilada mediante aglutinantes derivados de SH3 de Fyn descritos en el documento WO2011/023685: (A) aglutinante de IL-17 derivado de SH3 de Fyn 2C1 (SEQ ID NO: 107 descrito en el documento WO2011/023685). (B) aglutinante de IL-17 derivado de SH3 de Fyn A1_2 ("A1") (SEQ ID NO: 53 descrito en el documento WO2011/023685). (C) aglutinante de IL-17 derivado de SH3 de Fyn B1_2 ("B1") (SEQ ID NO: 39 descrito en el documento WO2011/023685).

45

La figura 4 muestra los cromatogramas de exclusión molecular (SEC) de los polipéptidos de unión a IL-17A/TNF α biespecíficos de la invención: (A) LC11L5-B06 (construcción biespecífica (de acuerdo con la invención) con cadena pesada y cadena ligera que consisten en las secuencia de las SEQ ID NO: 12 y 16, respectivamente) y (B) LC11L9-C09 (construcción biespecífica (de acuerdo con la invención) con cadena pesada y cadena ligera que consisten en las secuencias de las SEQ ID NO: 12 y 17, respectivamente).

50

La figura 5 muestra la inhibición simultánea de IL-17A y TNF α por las proteínas de fusión anti-IL-17A/TNF α biespecíficas. Los niveles en ELISA de Gro-alfa en los sobrenadantes se muestran después de la estimulación de células HT-29 con TNF α 200 pM e IL-17A 400 pM. Después de la adición de las concentraciones indicadas de LC11L5-B06 (SEQ ID NO: 12 (cadena pesada) y 16 (fusión de cadena ligera)) (figura 5.A) o LC11L9-C09 (SEQ ID NO: 12 (cadena pesada) y 17 (fusión de cadena ligera)) (figura 5.B), puede observarse una inhibición dependiente de la dosis de IL-17A y TNF α , dado que los niveles de Gro-alfa disminuyen con concentraciones más elevadas de los inhibidores. Como controles, las células se trataron con las citoquinas individuales (IL-17A o TNF α) o con medio solamente. Se muestran valores medios de triplicados, las barras de error representan desviaciones típicas (SD).

55

60

La figura 6 representa la inhibición de IL-17A y TNF α humanos *in vivo*. (A) y (B): a los ratones se les inyectó por vía intravenosa (i.v.) con LC11L5-B06 (designado como "LC-B06") (SEQ ID NO: 12 (cadena pesada) y 16 (fusión de

65

cadena ligera)), seguido por inyección s.c. de IL-17A humana (hIL-17A) (A) o TNF α humano (hTNF α) (B). Dos horas después de la administración de la citoquina indicada, se tomaron muestras de sangre de los ratones y los niveles de KC se detectaron mediante ELISA. Los ratones que recibieron una inyección intravenosa del anticuerpo anti-TNF α (figura 6.B) ("aTNF α mAb") o PBS también se muestran. Como control, se muestran niveles basales de KC (ratones tratados con PBS solamente (i.v.), sin estimulación con citoquinas). (C) y (D): LC11L9-C09 (designado como "LC-C09") (SEQ ID NO: 12 (cadena pesada) y 17 (fusión de cadena ligera)) se inyectaron por vía intravenosa (i.v.) en ratones, seguidos por inyección s.c. de IL-17A (C) o TNF α (D). Dos horas después de la administración de la citoquina indicada, se tomaron muestras de sangre de los ratones y los niveles de KC se detectaron mediante ELISA. Los ratones que recibieron una inyección intravenosa del anticuerpo anti-TNF α (figura 6.D) ("aTNF α mAb") o PBS también se muestran. Como control, se muestran niveles basales de KC (ratones tratados con PBS solamente (i.v.), sin estimulación con citoquinas). Se muestran los niveles medios de KC de 5 ratones por grupo (\pm SEM).

La figura 7 muestra las concentraciones séricas de (A) LC11L5-B06 (SEQ ID NO: 12 (cadena pesada) y 16 (fusión de cadena ligera)) y (B) LC11L9-C09 (SEQ ID NO: 12 (cadena pesada) y 17 (fusión de cadena ligera)) en diferentes puntos temporales después de una única inyección i.v. en ratones C57BL/6. La concentración en suero se determinó mediante ELISA usando tanto TNF α como IL-17A como agentes de captura (indicados entre paréntesis). Los últimos puntos temporales (24 h - 168 h) se usaron para calcular las semi-vidas terminales. Concentraciones séricas medias de 5 ratones se representan gráficamente frente al tiempo, las barras de error representan desviaciones típicas (SD).

La figura 8 muestra un alineamiento de secuencia de las SEQ ID NO: 3 a 9 y 20. Las SEQ ID NO 3 a 9 corresponden a las designaciones internas también en los ejemplos de la solicitud, tal como es evidente a partir de la figura 8.

La figura 9 representa los resultados de la inhibición *in vitro* dependiente de la dosis de IL-17A glucosilada y no glucosilada mediante el polipéptido derivado de SH3 de Fyn de la invención 11L11-A09 (SEQ ID NO: 9).

La figura 10 muestra la inhibición de IL-17A por las proteínas de fusión anti-IL-17A/TNF α biespecíficas LC11L5-B06 y LC11L9-C09. Los niveles en ELISA de IL-6 en los sobrenadantes del cultivo celular se muestran después de la estimulación de células NHDF con IL-17A e IL-1 β ("IL-17A/IL-1 β "). Después de la adición de las concentraciones indicadas de LC11L5-B06 (SEQ ID NO: 12 (cadena pesada) y 16 (fusión de cadena ligera)) o LC11L9-C09 (SEQ ID NO: 12 (cadena pesada) y 17 (fusión de cadena ligera)), se observó una inhibición dependiente de la dosis de liberación de IL-6 mediada por IL-17A. En experimentos de control, las células se trataron con las citoquinas individuales ("IL-17A" o "IL-1 β ") o con medio de cultivo celular solamente ("Medio"). Se muestran valores medios de triplicados, las barras de error representan desviaciones típicas (SD).

La figura 11 muestra los métodos de ELISA en sándwich y ELISA directo. (*izquierda*) ELISA en sándwich se realizó para detectar moléculas de LC11L5-B06 y LC11L9-C09 intactas. TNF biotinilado se inmovilizó en los pocillos de placas de 96 pocillos de microvaloración recubiertas de neutravidina. Plasma que contenía LC11L5-B06 o LC11L9-C09 se añadió a las células. Para detección, se usó IL-17A marcada con digoxigenina, seguida por un conjugado de anticuerpo anti-digoxigenina-HRP para procesamiento del sustrato y desarrollo de color. (*derecha*) ELISA directo se realizó para detectar unión a TNF específica. TNF biotinilado se inmovilizó en los pocillos de placas de 96 pocillos de microvaloración recubiertas de neutravidina. Plasma que contenía LC11 L5-B06 o LC11 L9-C09 se añadió a las células. LC11L5-B06 o LC11L9-C09 unido se detectó usando un conjugado de anticuerpo anti-IgG humana-HRP para procesamiento del sustrato y desarrollo de color.

La figura 12 muestra las concentraciones plasmáticas de (A) LC11L5-B06 (SEQ ID NO: 12 (cadena pesada) y 16 (fusión de cadena ligera)) y (B) LC11L9-C09 (SEQ ID NO: 12 (cadena pesada) y 17 (fusión de cadena ligera)) en diferentes puntos temporales después de una única inyección i.v. en monos cinomolgo. La concentración en plasma se determinó mediante ELISA en sándwich usando TNF α como agente de captura e IL-17A marcada con digoxigenina seguida por un conjugado de anticuerpo anti-digoxigenina-HRP para procesamiento del sustrato y desarrollo de color. Las concentraciones plasmáticas medias de 3 monos cinomolgo se representan gráficamente frente al tiempo, las barras de error representan desviaciones típicas (SD).

La figura 13 muestra las concentraciones plasmáticas de LC11L5-B06 (A) o LC11L9-C09 (B) en monos cinomolgo determinadas mediante ELISA en sándwich y ELISA directo. Las concentraciones plasmáticas son comparables para ambas proteínas, lo que indica que LC11L5-B06 y LC11L9-C09 son estables en monos cinomolgo durante al menos 220 horas.

Los ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1: polipéptidos derivados de SH3 de Fyn de la invención se unen a IL-17A según lo determinado mediante ELISA de lisado monoclonal.

Métodos

Usando las fagotecas de Fynomer descritas en Schlatter et al. (Schlatter et al. (2012) mAbs, 4(4) p. 497-50) Proteínas de unión derivadas de SH3 de Fyn específicas para IL-17A se aislaron usando IL-17A recombinante (R&D Systems) como antígeno y presentación en fagos estándar como tecnología de selección (Grabulovski D. et al., (2007) J Biol Chem 282, p. 3196-3204, Viti, F. et al. (2000) Methods Enzymol. 326, 480-505). El polipéptido derivado de SH3 de Fyn de la invención 1L3-B09 (SEQ ID NO: 3) que porta la secuencia de bucle n-src "STHEYE" (SEQ ID NO: 2) se enriqueció durante el proceso de selección. 1L3-B09 (SEQ ID NO: 3) se unía a IL-17A (véase el ejemplo 2) y se descubrió sorprendentemente que inhibía IL-17A glucosilada tan bien como IL-17A no glucosilada (véase el ejemplo 3). A fin de obtener aglutinantes de IL-17A derivados de SH3 de Fyn con afinidades más elevadas, se usó 1L3-B09 (SEQ ID NO: 3) como plantilla para maduración por afinidad. La secuencia del bucle n-src "STHEYE" (SEQ ID NO: 2) se mantuvo constante y se combinó con un repertorio de bucle RT aleatorizado (6 residuos de aminoácidos designados como (X¹)(X²)(X³)(X⁴)(X⁵)(X⁶) en la SEQ ID NO: 1). El proceso de generación de bibliotecas de maduración por afinidad era esencialmente el mismo que el descrito para la clonación de la biblioteca sin exposición previa con un bucle RT aleatorizado ("biblioteca 0" en Schlatter et al. (2012) mAbs, 4(4) p. 497-50).

Después de las selecciones sin exposición previa y maduración por afinidad, polipéptidos derivados de SH3 de Fyn enriquecidos se cribaron para unión a IL-17A mediante ELISA del lisado. ADN que codifica las proteínas de unión derivadas de SH3 de Fyn se clonó en el vector de expresión bacteriana pQE12 (Qiagen) de modo que las construcciones resultantes portaban una marca myc-hexahistidina C-terminal tal como se describe en Grabulovski et al. (Grabulovski et al. (2007) JBC, 282, p. 3196-3204). Los polipéptidos se expresaron en el citosol de bacterias *E. coli* en un formato de 96 pocillos y 200 µl de lisado aclarado por pocillo se prepararon tal como se describe en Bertschinger et al. (Bertschinger et al. (2007) Protein Eng Des Sel 20(2): p. 57-68). En resumen, colonias bacterianas transformadas se tomaron de la placa de agar y se cultivaron en una placa de 96 pocillos de fondo redondo (Nunc, n.º de cat. 163320) en 200 µl de medio 2xYT que contenía 100 µg/ml de ampicilina y el 0,1 % (p/v) de glucosa. La expresión de proteínas se indujo después del cultivo durante 3 h a 37 °C y 200 r.p.m. añadiendo IPTG 1 mM (Applichem, Alemania). Las proteínas se expresaron durante una noche en un agitador rotatorio (200 r.p.m., 30 °C). Posteriormente, la placa de 96 pocillos se centrifugó a 1800 g durante 10 min y el sobrenadante se desechó. Los sedimentos bacterianos se resuspendieron en 200 µl de tampón de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0) que contenía 1 mg/ml de lisozima y se dejó durante 30 min en hielo. Seguidamente, las células bacterianas se lisaron mediante sonicación en un baño de agua (seis estallidos durante 10 s) y a continuación se centrifugaron a 1800 g durante 10 min. Se usaron lisados bacterianos monoclonales para ELISA: IL-17A biotinilada (producida en las instalaciones propias en células HEK EBNA, la biotinilación se realizó con NHS-PEO4-biotina (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante) se inmovilizó sobre pocillos recubiertos de estreptavidina (StreptaWells, High Bind, Roche), y después de bloquear con PBS, se aplicaron leche al 2 % (Rapilait, Migros, Suiza), 50 µl de PBS, leche al 4 % que contenía 6 µg/ml de anticuerpo anti-myc 9E10 (concentración final 3 µg/ml) y 50 µl de lisado bacteriano. Después de incubar durante 1 h y lavar, se detectaron polipéptidos derivados de SH3 de Fyn unidos con conjugado de anticuerpo antirratón-HRP (Sigma). La detección de actividad peroxidasa se realizó añadiendo sustrato BM blue POD (Roche) y la reacción se detuvo añadiendo H₂SO₄ 1 M. La secuencia de ADN de los aglutinantes específicos se verificó mediante secuenciación de ADN.

Resultados

Las secuencias de aminoácidos de polipéptidos derivados de SH3 de Fyn positivos en ELISA que se unen a IL-17A se presentan en las SEQ ID NO: 3 a 9, tal como se adjuntan en la lista de secuencias.

Ejemplo 2: polipéptidos derivados de SH3 de Fyn de la invención se unen a IL-17A humana glucosilada con afinidades elevadas.

Este ejemplo muestra los rendimientos de expresión de polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn y la caracterización de estos polipéptidos mediante experimentos de cromatografía de exclusión molecular y resonancia del plasmón superficial.

Métodos

a) Rendimientos de expresión de polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn

Polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn se expresaron en el citosol de bacterias *E. coli* TG1, así como se purificaron tal como se describe en Grabulovski et al. (Grabulovski et al. (2007) JBC, 282, p. 3196-3204).

b) Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

Para el polipéptido de unión a IL-17A derivado de SH3 de Fyn parental 1L3-B9 (SEQ ID NO: 3) se realizó cromatografía de exclusión molecular (SEC) en un sistema ÅKTA FPLC usando una columna corta Superdex 75 (5/150) (GE Healthcare). Las SEC de los clones madurados por afinidad 11L0-C06 (SEQ ID NO: 4), 11L5-B06 (SEQ

ID NO: 5), 11L6-F03 (SEQ ID NO: 6), 11L9-C09 (SEQ ID NO: 7), 11L10-A05 (SEQ ID NO: 8) y 11L11-A09 (SEQ ID NO: 9) se realizaron en un instrumento de HPLC Agilent Technologies 1200 Infinity Series usando una columna SEC-3 (Agilent).

c) Mediciones de afinidad

5 Las mediciones de afinidad se realizaron usando un instrumento BIAcore T200 (GE Healthcare). Para el análisis de interacción entre IL-17A glucosilada (producida en las instalaciones propias en células HEK EBNA) y polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn monoméricos, se usó un chip CM5 de la serie S (GE Healthcare) con 2000 UR de IL-17A inmovilizadas usando el kit de acoplamiento Amine (GE healthcare). El tampón de migración era PBS que contenía Tween 20 al 0,05 %. Las interacciones se midieron a un flujo de 30 μ l/min y la inyección de diferentes concentraciones de polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn. Todos los datos cinéticos de la interacción se evaluaron usando software de evaluación BIAcore T200.

15 **Resultados**

a) Rendimientos de expresión

Los rendimientos de expresión para polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn monoméricos de la invención variaban entre 14 y 57 mg/litro de cultivo bacteriano en condiciones no optimizadas en matraces de agitación (tabla 1).

Tabla 1. Rendimientos de expresión de polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn producidos en bacterias E. coli TG1

Fynomer	SEQ ID NO.	Rendimiento (mg/l)
1L3-B09	3	57
11L0-C06	4	43
11L5-B06	5	36
11L6-F03	6	14
11L9-C09	7	14
11L10-A05	8	32
11L11-A09	9	35

25 b) Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

Los perfiles de cromatografía de exclusión molecular (SEC) demostraron que todas las construcciones se eluían principalmente como picos monoméricos individuales (figura 1).

30 c) Mediciones de afinidad

Las propiedades de unión se analizaron mediante análisis de interacción en tiempo real en un chip BIAcore que revelaba las siguientes constantes de disociación (K_D) para polipéptidos de unión a IL-17A seleccionados:

Tabla 2. Constantes de cinética de la unión de polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn a IL-17A glucosilada humana recombinante (producida en células HEK EBNA).

Fynomer	SEQ ID NO.	K_D (nM)
1L3-B09	3	245
11L0-C06	4	7
11L5-B06	5	12
11L6-F03	6	11
11L9-C09	7	11
11L10-A05	8	7
11L11-A09	9	24

40 **Ejemplo 3:** polipéptidos derivados de SH3 de Fyn de la invención inhiben IL-17A glucosilada

El clon parental 1L3-B09 y cinco polipéptidos derivados de SH3 de Fyn madurados por afinidad de la invención con la afinidad más elevada por IL-17A (11L0-C06 (SEQ ID NO: 4), 11L5-B06 (SEQ ID NO: 5), 11L6-F03 (SEQ ID NO: 6), 11L9-C09 (SEQ ID NO: 7), 11L10-A05 (SEQ ID NO: 8)) se han ensayado por su capacidad para inhibir IL-17A: IL-17A y $TNF\alpha$ inducen la producción de IL-6 en fibroblastos de manera dependiente de la dosis. Las actividades inhibitorias de los polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn indicados se ensayaron estimulando fibroblastos dérmicos humanos con IL-17A glucosilada recombinante (producida en las instalaciones propias en células HEK EBNA) y $TNF\alpha$ recombinante (Thermo Fisher Scientific) en ausencia o presencia de diversas concentraciones de polipéptidos de unión a IL-17A derivados de SH3 de Fyn de la invención. Los sobrenadantes de cultivo celular se recogieron después de 24 h de estimulación y la concentración de IL-6 en el sobrenadante se

determinó mediante ELISA. Los resultados muestran que los polipéptidos de unión a IL-17A fueron capaces de inhibir específicamente IL-17A glucosilada.

Métodos

5 Para la eliminación de endotoxinas, las soluciones de proteínas se filtraron tres veces con la membrana Acrodisc Mustang E (VWR). Después de la filtración, los niveles de endotoxinas de las soluciones de proteínas que contenían polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn inhibidores, de la invención eran menores de 0,1 UE/ml, según lo determinado mediante el ensayo de lisado de amebocito de Limulus (LAL) (PYROGENT Single test Gel Clot LAL Assay (Lonza)).

10 100 μ l de una suspensión celular que contenía aproximadamente 3900 fibroblastos dérmicos humanos normales (PromoCell, NHDF-c, C12300) se distribuyeron por pocillo (placa de 96 pocillos, TPP o Corning) y se cultivaron durante 24 horas a 37 °C (medio: medio de cultivo de fibroblastos C-23010, PromoCell). El sobrenadante se aspiró y, después de mezclar diferentes concentraciones de polipéptidos de unión a IL-17A derivados de SH3 de Fyn de la invención con medio que contenía IL-17A y TNF α (concentraciones finales 1 ng/ml y 50 pg/ml respectivamente), se añadieron 100 μ l de la solución correspondiente por pocillo. Como controles PBS se mezcló con el medio que contenía IL-17A/TNF α (control pos. = "sin inhibidor") y medio con las citoquinas individuales IL-17A o TNF α solamente (siendo este último el pocillo de "control de TNF α "). Como control negativo, PBS se mezcló con medio solamente. Para comparación, el ensayo también se ha realizado usando IL-17A no glucosilada (R&D Systems) usando las mismas condiciones. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, el sobrenadante se ensayó un ELISA para determinar la concentración de IL-6 usando un kit de ELISA de IL-6 siguiendo las instrucciones del fabricante (IL-6 ELISA kit, R&D Systems). Los porcentajes de inhibición se representaron gráficamente y los valores de CI₅₀ se calcularon usando el software Prism 5.

25 El porcentaje de inhibición de IL-17A se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición (100)} = 100 - \frac{((A450-650 \text{ nm (muestra)} - A450-650 \text{ nm (TNF}\alpha \text{ control})) \times 100)}{(A450 - 650 \text{ nm (control pos.)} - A450 - 650 \text{ nm (TNF}\alpha \text{ control)})}$$

Resultados

30 Fibroblastos dérmicos humanos normales se incubaron con IL-17A/TNF α y diferentes concentraciones de polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn indicados de la invención. Se observó que los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn de la invención inhibían IL-17A glucosilada. Los valores de CI₅₀ se muestran en la tabla 3. La figura 2 muestra las curvas de inhibición dependiente de la dosis de los polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn indicados de la invención que inhiben tanto IL-17A glucosilada como no glucosilada. Se descubrió sorprendentemente que los polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn descritos en esta invención son capaces de inhibir completamente IL-17A glucosilada con potencias similares en comparación con IL-17A no glucosilada. Ésta es una propiedad ventajosa en comparación con los polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn que se inventaron previamente (WO2011/023685). La figura 3 muestra tres ejemplos de polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn descritos en el documento WO2011/023685 (aglutinante de IL-17 derivado de SH3 de Fyn 2C1 (SEQ ID NO: 107 descrito en el documento WO2011/023685), aglutinante de IL-17 derivado de SH3 de Fyn A1_2 (SEQ ID NO: 53 descrito en el documento WO2011/023685) y aglutinante de IL-17 derivado de SH3 de Fyn 81_2 ("B1") (SEQ ID NO: 39 descrito en el documento WO2011/023685) que no inhiben IL-17A glucosilada completamente ni siquiera a concentraciones elevadas y/o muestran grandes diferencias en potencia de inhibición (valores de CI₅₀) entre IL-17A glucosilada y no glucosilada (véase la figura 3).

45 Tabla 3. Valores de CI₅₀ para inhibición de IL-17A glucosilada obtenidos para los polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn.

Fynomer	SEQ ID NO.	Valor de CI ₅₀ (nM)
1L3-B09 (clon parental)	3	300
11L0-C06	4	35
11L5-B06	5	43
11L6-F03	6	63
11L9-C09	7	32
11L0-A05	8	28

50 **Ejemplo 4:** Rendimientos de expresión y purificación de fusiones de anticuerpo anti-IL-17A/TNF α biespecífico-polipéptido de unión a IL-17A derivado de SH3 de Fyn

Los polipéptidos de unión a IL-17A derivados del SH3 de Fyn (11L5-B06 (SEQ ID NO: 5) e 11L9-C09 (SEQ ID NO: 7)) se han fusionado genéticamente al extremo C de la cadena ligera de un anticuerpo anti-TNF α (SEQ ID NO: 11) mediante un enlazador de 15 aminoácidos (enlazador: SEQ ID NO: 15). Las construcciones anti-IL-17AITNF α biespecíficas resultantes denominadas LC11L5-B06 (construcción biespecífica (de acuerdo con la invención) con cadena pesada y cadena ligera que consisten en las secuencias de las SEQ ID NO: 12 y 16, respectivamente) y

LC11L9-C09 (construcción biespecífica (de acuerdo con la invención) con cadena pesada y cadena ligera que consisten en las secuencias de las SEQ ID NO: 12 y 17, respectivamente) se transfectaron transitoriamente en células FreeStyle CHO-S y se expresaron en medios libres de suero/libres de componente animal durante 6-10 días. Las proteínas se purificaron a partir de los sobrenadantes mediante cromatografía por afinidad con Proteína A (columna Mab Select Sure; GE Healthcare) y mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC; columna Superdex G200, 30/100 GL; GE Healthcare) en un instrumento Akta Purifier (GE Healthcare). Las concentraciones se determinaron mediante mediciones de absorbancia a 280 nm. Los rendimientos se enumeran en la tabla 4.

Tabla 4. Rendimientos de purificación de fusiones de anticuerpo-polipéptidos de unión a IL-17A derivados de SH3 de Fyn biespecíficas producidas en células CHO-S transfectadas de forma transitoria.

	SEQ ID NO (cadena pesada, cadena ligera)	Rendimiento (mg/l)
LC11L5-B06	12, 16	110
LC11L9-C09	12, 17	110

Después de la purificación, se ha realizado cromatografía de exclusión molecular usando un sistema ÄKTA FPLC y una columna Superdex G200, 30/100 GL (GE Healthcare). Los perfiles de cromatografía de exclusión molecular (SEC) después de la purificación demostraron que ambas proteínas de fusión se eluían como picos monoméricos individuales, mostrando que las proteínas de fusión tienen excelentes propiedades biofísicas (figura 4).

Ejemplo 5: mediciones de afinidad de fusiones de anticuerpo-polipéptidos de unión a IL-17A derivados de SH3 de Fyn a IL-17A y TNF α humanos y de cinomolgo

Las afinidades de LC11L5-B06 y LC11L9-C09 por IL-17A (humana y de Cinomolgo) y por TNF α (humano y de Cinomolgo) se midieron usando un instrumento BIAcore T200 (GE Healthcare). Un chip CM5 de la Serie S (GE Healthcare) se revistió con 8000 UR de anticuerpo específico de Fc de cabra anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch). El tampón de migración era PBS que contenía Tween 20 al 0,05 %. Las interacciones se midieron capturando aproximadamente de 400 a 500 UR de LC11L5-B06 o LC11L9-C09 a un caudal de 30 μ l/min, seguido por inyección de diferentes concentraciones de los antígenos a un caudal de 30 μ l/min. Todos los datos cinéticos de la interacción se evaluaron usando el software de evaluación BIAcore T200. Las afinidades se enumeran en la tabla 5 para los antígenos humanos y en la tabla 6 para los antígenos de Cinomolgo.

Tabla 5. Constantes de disociación de la unión de fusiones de anticuerpo-polipéptidos de unión a IL-17A derivados de SH3 de Fyn a IL-17A glucosilada humana recombinante, y TNF α humano.

	SEQ ID NO (cadena pesada, cadena ligera)	Valores de K _D para IL-17A humana glucosilada (pM)	Valores de K _D para TNF α humano (pM)
LC11L5-B06	12, 16	44	144
LC11L9-C09	12, 17	48	89

Tabla 6. Constantes de disociación de la unión de fusiones de anticuerpo-polipéptidos de unión a IL-17A derivados de SH3 de Fyn a IL-17A glucosilada de Cinomolgo recombinante, y TNF α de Cinomolgo.

	SEQ ID NO (cadena pesada, cadena ligera)	Valores de K _D para IL-17A de Cinomolgo glucosilada (pM)	Valores de K _D para TNF α de Cinomolgo glucosilado (pM)
LC11L5-B06	12, 16	63	120
LC11L9-C09	12, 17	70	133

Ejemplo 6: LC11L5-B06 y LC11L9-C09 inhiben IL-17A y TNF α simultáneamente

IL-17A y TNF α inducen la producción de Gro- α en células HT-29 (línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano) de manera dependiente de la dosis. Las actividades inhibitorias de las construcciones indicadas (LC11L5-B06 y LC11L9-C09) se ensayaron estimulando células HT-29 (línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano) con IL-17A glucosilada y TNF α en ausencia o presencia de diversas concentraciones de LC11L5-B06 y LC11L9-C09. Los sobrenadantes de cultivo celular se recogieron después de 48 h de estimulación y se ensayaron para Gro- α con ELISA.

Métodos

LC11L5-B06 o LC11L9-C09 se diluyeron en medio de ensayo (medio 5A de McCoy (GIBCO) suplementado con FBS al 10 %). 50 μ l de cada concentración indicada se mezclaron con 50 μ l de medio de ensayo que contenía IL-17A (producida en las instalaciones propias en células HEK EBNA) y TNF α (Thermo Fisher Scientific) a las concentraciones finales de 400 pM y 200 pM respectivamente. Como control, se preparó medio sin inhibidor. Además, se preparó medio con las citoquinas individuales solamente o sin citoquinas. Después de 1 hora de incubación, 100 μ l de una suspensión celular que contenía aproximadamente 20.000 células HT-29 (ATCC, #HTB-38) se añadieron a las soluciones y se distribuyeron por pocillo (placa de 96 pocillos, TPP o Corning) y se cultivaron

durante 48 horas a 37 °C y el 5 % de CO₂. Después de 48 horas de incubación a 37 °C el sobrenadante se retiró y la concentración de Gro- α se determinó mediante ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Gro- α ELISA kit, R&D Systems).

Resultados

La figura 5 muestra la concentración de Gro-alfa (representada como la señal de ELISA) en el sobrenadante de células HT-29 después de estimulación con IL-17A, TNF α y una combinación de los mismos. Tal como se muestra en la figura 5, las construcciones biespecíficas LC11L5-B06 y LC11L9-C09 fueron capaces de inhibir de manera dependiente de la dosis simultáneamente IL-17A y TNF α . Los valores de CI₅₀ aparentes obtenidos (tabla 7) demuestran que los compuestos biespecíficos de la invención son capaces de inhibir IL-17A y TNF α con elevada potencia.

Tabla 7. Valores de CI₅₀ aparentes para inhibición simultánea de IL-17A y TNF α obtenidos para fusiones de anticuerpo-polipéptidos de unión a IL-17A derivados de SH3 de Fyn biespecíficas.

	SEQ ID NO (cadena pesada, cadena ligera)	Valor de CI ₅₀ aparente (pM) para inhibición simultánea de IL-17A y TNF α
LC11L5-B06	-12, 16	247
LC11L9-C09	12, 17	222

Ejemplo 7: LC11L5-B06 y LC11L9-C09 inhiben IL-17A y TNF α *in vivo*

La capacidad de LC11L5-B06 y LC11L9-C09 para inhibir IL-17A y TNF α *in vivo* se determinó usando un modelo de inflamación aguda en ratones C57BL/6. IL-17A humana se une a y estimula el receptor IL-17 de ratón. Cuando se inyecta en ratones, IL-17A desencadena un incremento masivo de quimioquina KC (CXCL1), que es detectable en el plazo de 1-4 horas en el suero y los fluidos de lavado de ratones inyectados. Pueden realizarse observaciones similares para TNF α humana, lo que también causa un incremento significativo de los niveles de KC-suero cuando se inyecta en ratones.

Métodos

Ratones (C57BL/6, Charles River) se inyectaron por vía intravenosa con los inhibidores LC11L5-B06 (2 mg/kg), LC11L9-C09 (2 mg/kg) o como control para inhibición de TNF un anticuerpo anti-TNF α disponible en el mercado (2 mg/kg) (adalimumab (HUMIRA®)) diluido en PBS libre de endotoxinas (5 ratones por grupo). 3,5 horas después de la inyección intravenosa de los inhibidores, la expresión de KC se estimuló con IL-17A humana o TNF α humano mediante administración subcutánea (3 μ g de IL-17A por ratón o 0,25 μ g de TNF α por ratón). Dos horas más tarde, se extrajo sangre para muestreo de suero y la concentración de KC se determinó usando un kit KC ELISA disponible en el mercado siguiendo las instrucciones del fabricante (Quantikine mouse KC immunoassay, R&D Systems).

Resultados

Después de la inyección s.c. de IL-17A o TNF α humanos en ratones, los animales sobreexpresan una quimioquina llamada KC. Niveles de KC elevados en los sueros de ratones pueden medirse mediante ELISA. Inyección *i.v.* previa de fusiones del polipéptido derivado de SH3 de Fyn de la invención (LC11L5-B06 y LC11L9-C09) y el anticuerpo anti-TNF α de control (figura 6.B y 6.D) impedía la regulación positiva de KC *in vivo*. La figura 6 muestra las potentes propiedades de inhibición de LC11L5-B06 (designada como "LC-B06") y LC11L9-C09 (designada como "LC-C09").

Ejemplo 8: LC11L5-B06 y LC11L9-C09 muestran un perfil PK similar a un anticuerpo *in vivo*

Las propiedades farmacocinéticas *in vivo* de las proteínas de fusión de la invención LC11L5-B06 y LC11L9-C09 se determinaron midiendo las concentraciones mediante ELISA en suero de ratón recogido en diferentes puntos temporales después de una única inyección *i.v.*

Métodos

LC11L5-B06 y LC11L9-C09 se inyectaron por vía intravenosa en 5 ratones (C57BL/6, Charles River) a una dosis de 10 mg/kg. Después de 10 minutos, 6, 24, 48, 96, 120, 144 y 168 horas, aproximadamente 20 μ l de sangre se extrajeron de la vena safena con el capilar Microvette CB 300 (Sarstedt). Las muestras de sangre se centrifugaron durante 10 min a 9500 x g y el suero se almacenó a -20 °C hasta que se realizó el análisis por ELISA. Usando series de dilución con concentraciones conocidas de LC11L5-B06 y LC11L9-C09, la concentración en suero se determinó mediante ELISA usando tanto TNF α como IL-17A como agentes de captura: 50 μ l de IL-17A biotinilada (120 nM) (R&D Systems, biotinilada usando EZ-link NHS-PGE4-biotin (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante) o 50 μ l de TNF α biotinilado (10 nM) (Thermo Scientific, biotinilado usando EZ-link NHS-PGE4-biotin (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante) se añadieron a pocillos recubiertos con estreptavidina (Reactibind,

Pierce) y, después del bloqueo con 200 μ l de PBS, leche al 4 % (Rapilait, Migros, Suiza), se añadieron 50 μ l de muestras de suero diluidas (en PBS, leche al 4 %). Después de la incubación durante 1 h y lavado con PBS, proteínas de fusión de Fynomer unidas a anticuerpo se detectaron con conjugado de proteína A-HRP (Sigma). La actividad peroxidasa se detectó mediante adición de sustrato HRP quimiofluorescente potenciado por QuantaRed (Pierce). La intensidad de fluorescencia se midió después de 1 a 5 min a 544 nm (excitación) y 590 nm (emisión). A partir de las concentraciones de LC11L5-B06 y LC11L9-C09 determinadas en suero en diferentes puntos temporales y la pendiente resultante k de la fase de eliminación (representada en una escala semilogarítmica), las semividas se calcularon usando la fórmula $t_{1/2} = \ln 2 / -k$.

10 Resultados

Las concentraciones séricas de LC11L5-B06 y LC11L9-C09 se muestran en la figura 7. Las semividas determinadas a partir de la fase de eliminación (fase beta, puntos temporales 24 h - 168 h) variaban entre 4,9 días y 9,6 días para ambas proteínas de fusión (véase la tabla 8), que es el mismo intervalo que los valores de semivida descritos para productos terapéuticos de anticuerpo estándar inyectados en ratones. Estos datos demuestran que LC11L5-B06 y LC11L9-C09 tienen propiedades PK *in vivo* similares a IgG.

Tabla 8. Valores de semivida terminal para las fusiones de anticuerpo-polipéptidos de unión a IL-17A derivados de SH3 de Fyn biespecíficas.

	SEQ ID NO (cadena pesada, cadena ligera)	Semivida (días)
LC11L5-B06 (detección de IL-17A)	12, 16	6,2
LC11L5-B06 (detección de TNF α)	12, 16	9,6
LC11L9-C09 (detección de IL-17A)	12, 17	4,9
LC11L9-C09 (detección de TNF α)	12, 17	9,6

Ejemplo 9: el polipéptido derivado de SH3 de Fyn de la invención 11L11-A09 inhibe IL-17A glucosilada

Fynomer 11L11-A09 (SEQ ID NO: 9) ha sido ensayado por su capacidad para inhibir IL-17A.

Métodos

Las condiciones experimentales eran las mismas que las descritas en el ejemplo 3 para los otros polipéptidos derivados de SH3 de Fyn de la invención (SEQ ID NO: 3 - 8).

Resultados

Fibroblastos dérmicos humanos normales se incubaron con IL-17A/TNF α y diferentes concentraciones del polipéptido derivado de SH3 de Fyn de la invención 11L11-A09 (SEQ ID NO: 9). Se observó que 11L11-A09 (SEQ ID NO: 9) inhibía IL-17A glucosilada con un valor de CI_{50} de 66 nM (tabla 9). La figura 9 muestra las curvas de inhibición dependiente de la dosis del polipéptido derivado de SH3 de Fyn de la invención 11L11-A09 (SEQ ID NO: 9), que inhibe tanto IL-17A glucosilada como no glucosilada con una potencia y eficacia comparables.

Tabla 9. Valor de CI_{50} para inhibición de IL-17A glucosilada obtenido para el polipéptido de unión a IL-17A derivado de SH3 de Fyn 11L11-A09 (SEQ ID NO: 9).

Fynomer	SEQ ID NO.	Valor de CI_{50} (nM)
11L11-A09	9	66

Ejemplo 10: LC11L5-B06 y LC11 L9-C09 inhiben IL-17A glucosilada con elevada potencia

Este ejemplo demuestra además la capacidad de los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn de la invención de inhibir específicamente IL-17A glucosilada. Construcciones anti-IL-17A/TNF α biespecíficas LC11 L5-B06 (construcción biespecífica (de acuerdo con la invención) con cadena pesada y cadena ligera que consisten en las secuencias de las SEQ ID NO: 12 y 16, respectivamente) y LC11 L9-C09 (construcción biespecífica (de acuerdo con la invención) con cadena pesada y cadena ligera que consisten en las secuencias de las SEQ ID NO: 12 y 17, respectivamente) se expresaron y purificaron tal como se ha descrito en el ejemplo 4. Las actividades inhibitoras de LC11L5-B06 y LC11L9-C09 se ensayaron estimulando fibroblastos dérmicos humanos normales (células NHDF) con IL-17A glucosilada recombinante (producida en instalaciones propias en células HEK EBNA) e IL-1 β recombinante (R&D Systems) para producir IL-6 en ausencia o presencia de diversas concentraciones de LC11L5-B06 o LC11L9-C09. Los sobrenadantes de cultivo celular se retiraron después de 16 - 24 h de estimulación y la concentración de IL-6 en el sobrenadante se determinó mediante ELISA. Los resultados muestran que las proteínas de fusión que comprenden los polipéptidos de unión a IL-17A de la invención fueron capaces de inhibir específicamente IL-17A glucosilada.

Métodos

100 µl de una suspensión celular que contenía aproximadamente 3900 Fibroblastos dérmicos humanos normales (PromoCell, NHDF-c, C12300) se distribuyeron por pocillos (placa de 96 pocillos, TPP) y se cultivaron durante 24 horas a 37 °C/5 % de CO₂ (medio: medio de cultivo de fibroblastos C-23010, PromoCell). El sobrenadante se aspiró y, después de mezclar diferentes concentraciones de LC11L5-B06 o LC11L9-C09 (concentraciones finales mostradas en la figura 10) con medio que contenía IL-17A e IL-1β (concentraciones finales: IL-17A: 64 pM; IL-1β: 10 fM), 100 µl de la solución correspondiente se añadieron a las células (triplicados). En experimentos de control, PBS se mezcló con el medio que contenía IL-17A/IL-1β ("IL-17A/IL-1β") y medio con las citoquinas individuales "IL-17^{aa}" o "IL-1β" solamente (siendo el último los pocillos de control de "IL-17^{aa}" e "IL-1β"). Como control negativo, PBS se mezcló con medio solamente ("Medio"). Después de 16 - 24 horas de incubación a 37 °C / 5 % de CO₂, la concentración de IL-6 en el sobrenadante se determinó usando un kit de ELISA de IL-6 siguiendo las instrucciones del fabricante (IL-6 ELISA kit, R&D Systems). Para el cálculo de los valores de CI₅₀, los porcentajes de inhibición se determinaron y los valores de CI₅₀ se calcularon usando el software Prism 5.

El porcentaje de inhibición de IL-17A se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición (100)} = 100 - \frac{((A450-650 \text{ nm (muestra)} - A450-650 \text{ nm (IL-1}\beta)) \times 100)}{(A450 - 650 \text{ nm (IL-17A/IL-1}\beta) - A450 - 650 \text{ nm (IL-1}\beta))}$$

Resultados

La figura 10 muestra los valores de ELISA (absorbancia) obtenidos para la determinación de concentraciones de IL-6 en los sobrenadantes de células NHDF. Tal como se muestra en la figura 10, las construcciones biespecíficas LC11L5-B06 y LC11L9-C09 fueron capaces de inhibir la producción de IL-6 mediada por IL-17A de manera dependiente de la dosis, demostrando que eran capaces de inhibir específicamente IL-17A glucosilada. Tal como se esperaba, la liberación de IL-6 inducida por IL-1β no se pudo inhibir. Los valores de CI₅₀ obtenidos para la inhibición de IL-17A (tabla 10) muestran que los compuestos biespecíficos de la invención son capaces de inhibir IL-17A con elevada potencia.

Tabla 10. Valores de CI₅₀ para la inhibición de IL-17A obtenidos para fusiones de anticuerpo-polipéptido de unión a IL-17A derivado de SH3 de Fyn biespecíficas.

	SEQ ID NO (cadena pesada, cadena ligera)	Valor de CI ₅₀ (pM) para la inhibición de IL-17A
LC11L5-B06	12, 16	121
LC11L9-C09	12, 17	66

Ejemplo 11: LC11L5-B06 y LC11L9-C09 son estables *in vivo* y muestran una semivida larga en mono cinomolgo

Las propiedades farmacocinéticas de las proteínas de fusión de la invención LC11L5-B06 y LC11L9-C09 se determinaron midiendo sus concentraciones en mono cinomolgo en diferentes puntos temporales después de una única inyección i.v. Usando series de dilución con concentraciones conocidas de LC11L5-B06 y LC11L9-C09, la concentración en plasma se determinó usando un "ELISA en sándwich", que garantiza la medición de solamente moléculas biespecíficas completamente funcionales e intactas LC11L5-B06 y LC11L9-C09. Para demostrar adicionalmente que LC11L5-B06 y LC11 L9-C09 permanecen intactas y los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn de la invención no se escinden del anticuerpo *in vivo* (en monos cinomolgo) se desarrolló un ELISA adicional, que detecta solamente el componente de anticuerpo de las proteínas de fusión ("ELISA directo"). Los dos métodos de detección por ELISA se ilustran en la figura 11.

Métodos

Las construcciones anti-IL-17A/TNFα biespecíficas LC11L5-B06 (construcción biespecífica (de acuerdo con la invención) con cadena pesada y cadena ligera que consiste en las secuencias de las SEQ ID NO: 12 y 16, respectivamente) y LC11L9-C09 (construcción biespecífica (de acuerdo con la invención) con cadena pesada y cadena ligera que consisten en las secuencias de las SEQ ID NO: 12 y 17, respectivamente) se expresaron y se purificaron tal como se describe en el ejemplo 4. LC11L5-B06 y LC11L9-C09 se inyectaron por vía intravenosa en 3 monos cinomolgo macho a una dosis de 3 mg/kg. Se extrajo sangre de venas periféricas en los puntos temporales indicados después del final de la administración de la dosis (0,6 ml de volumen de recogida por muestra). Se usó solución de EDTA (7,5 %) como anticoagulante. Después de la recogida de sangre, las muestras se centrifugaron a 4 °C durante 10 min a 1200 g, y el plasma se almacenó a -80 °C hasta análisis mediante ELISA.

"ELISA en sándwich": Pocillos recubiertos con neutravidina (Biomat MCP44-11) se bloquearon con 150 µl/pocillo de tampón de bloqueo (1X PBS - BSA al 5 %) durante 60 minutos a temperatura ambiente (TA) con agitación roto-orbital suave ajustada a 300 rpm. Los pocillos se lavaron con 200 µl/pocillo de tampón de lavado (1X PBS - Tween 20 al 0,1 %) y a continuación se incubaron con 100 µl/pocillo de una solución que contenía 0,2 µg/ml de TNF-alfa biotinilado (PeproTech, biotinilado usando un kit de marcado con biotina de ANP Technologies de acuerdo con las

instrucciones del fabricante) diluido en tampón de ensayo (1X PBS - BSA al 1 %) durante 60 minutos a TA con agitación suave. Después de tres lavados con 200 µl/pocillo de tampón de lavado, muestras, diluidas a 1:4 en tampón de ensayo se dispensaron a los pocillos (100 µl/pocillo) y se incubaron durante 1 hora con agitación suave. La placa se lavó 3 veces (200 µl/pocillo) con tampón de lavado antes de la adición de 100 µl/pocillo de una solución que contenía 64 ng/ml de IL-17A digoxigenilada (PrepoTech, marcada con digoxigenina usando un Digoxigenin Labeling Kit, adquirido de Solulink, siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor) diluida en tampón de ensayo. Una incubación adicional durante 1 hora a TA, con agitación suave, se llevó a cabo a continuación. Después de 3 lavados (200 µl/pocillo) con tampón de lavado, la placa se incubó con 100 µl/pocillo del anticuerpo conjugado anti-digoxigenina HRP (Roche), diluido a 1:10000 en tampón de ensayo. La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 60 minutos a 300 rpm. La placa se lavó 3 veces (200 µl/pocillo) con tampón de lavado y 100 µl/pocillo de TMB (Sigma) se añadieron inmediatamente y se incubaron durante 5-10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Una alícuota (100 µl/pocillo) de solución de detención se añadió finalmente a cada pocillo para detener la reacción enzimática. La densidad óptica se midió a 450 nm usando un lector de placas de microvaloración Victor²V (Wallac Perkin Elmer).

"ELISA directo": 96 pocillos recubiertos de neutravidina (Biomat MCP44-11) se bloquearon con 150 µl/pocillo de tampón de bloqueo (1X PBS - BSA al 5 %) durante 60 minutos a TA con agitación roto-orbital suave ajustada a 300 rpm. Los pocillos se lavaron con 200 µl/pocillo de tampón de lavado (1X PBS - Tween20 al 0,1 %) y a continuación se incubaron con 100 µl/pocillo de una solución de 0,2 µg/ml de TNF-alfa biotinilado diluida en tampón de ensayo (1X PBS - BSA al 1 %) durante 60 minutos a TA con agitación suave. Después de tres lavados con 200 µl/pocillo de tampón de lavado, muestras, diluidas a 1:4 en tampón de ensayo, se dispensaron a los pocillos (100 µl/pocillo) y se incubaron durante 1 hora con agitación suave. La placa se lavó 3 veces (200 µl/pocillo) con tampón de lavado antes de la adición de 100 µl/pocillo de una solución de 44 ng/ml de anticuerpo adsorbido de mono anti IgG humano conjugado a HRP (ABCam) diluido en tampón de ensayo. Una incubación adicional durante 1 hora a TA, con agitación suave, se llevó a cabo a continuación. La placa se lavó 3 veces (200 µl/pocillo) con tampón de lavado y 100 µl/pocillo of TMB (Sigma) se añadieron inmediatamente y se incubaron durante 5-10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Una alícuota (100 µl/pocillo) de solución de detención se añadió finalmente a cada pocillo para detener la reacción enzimática. La densidad óptica se midió a 450 nm usando un lector de placas de microvaloración Victor²V (Wallac Perkin Elmer).

Se realizaron análisis farmacocinéticos para LC11L5-B06 y LC11L9-C09 con las concentraciones plasmáticas determinadas mediante los métodos de ELISA usando el paquete Watson (v. 7.4, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos).

Resultados

Las concentraciones plasmáticas de LC11L5-B06 y LC11L9-C09 se muestran en la figura 12. Ambos compuestos mostraban una baja aclaración de la sangre y una semi-vida terminal de varios días en monos cinomolgo, tal como se describe normalmente para productos terapéuticos de anticuerpo monoclonal estándar. De forma importante, las concentraciones plasmáticas obtenidas usando los dos métodos de ELISA diferentes son muy similares, demostrando que LC11L5-B06 y LC11L9-C09 son estables in vivo durante al menos 220 horas y que los polipéptidos derivados de SH3 de Fyn no son escindidos del anticuerpo en monos cinomolgo (figura 13).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Covagen AG

<120> Nuevas moléculas de unión a IL-17A y usos médicos de las mismas

<130> U2194 PCT

<150> EP 12185425.1

<151> 21-09-2012

<160> 20

<170> Patent In versión 3.5

<210> 1

<211> 64

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: alineamiento de secuencias"

<220>
 <221> variante
 <222> 12
 5 <223> /reemplazo = "Cys" /reemplazo = "Asp" /reemplazo = "Glu" /reemplazo = "Phe" /reemplazo = "Gly"
 /reemplazo = "His" /reemplazo = "Ile" /reemplazo = "Lys" /reemplazo = "Leu" /reemplazo = "Met" /reemplazo =
 "Asn" /reemplazo = "Pro" /reemplazo = "Gln" /reemplazo = "Arg" /re-place="Ser" /reemplazo = "Thr"
 /reemplazo = "Val" /reemplazo = "Trp" /reemplazo = "Tyr"

 10 <220>
 <221> variante
 <222> 13
 <223> /reemplazo = "Cys" /reemplazo = "Asp" /reemplazo = "Glu" /reemplazo = "Phe" /reemplazo = "Gly"
 /reemplazo = "His" /reemplazo = "Ile" /reemplazo = "Lys" /reemplazo = "Leu" /reemplazo = "Met" /reemplazo =
 15 "Asn" /reemplazo = "Pro" /reemplazo = "Gln" /reemplazo = "Arg" /reemplazo = "Ser" /reemplazo = "Thr"
 /reemplazo = "Val" /reemplazo = "Trp" /reemplazo = "Tyr"

 <220>
 <221> variante
 20 <222> 14
 <223> /reemplazo = "Cys" /reemplazo = "Asp" /reemplazo = "Glu" /reemplazo = "Phe" /reemplazo = "Gly"
 /reemplazo = "His" /reemplazo = "Ile" /reemplazo = "Lys" /reemplazo = "Leu" /reemplazo = "Met" /reemplazo =
 "ASn" /reemplazo = "Pro" /reemplazo = "Gln" /reemplazo = "Arg" /reemplazo = "Ser" /reemplazo = "Thr"
 /reemplazo = "Val" /reemplazo = "Trp" /reemplazo = "Tyr"
 25
 <220>
 <221> variante
 <222> 15
 <223> /reemplazo = "Cys" /reemplazo = "Asp" /reemplazo = "Glu" /reemplazo = "Phe" /reemplazo = "Gly"
 /reemplazo = "His" /reemplazo = "Ile" /reemplazo = "Lys" /reemplazo = "Leu" /reemplazo = "Met" /reemplazo =
 30 "Asn" /reemplazo = "Pro" /reemplazo = "Gln" /reemplazo = "Arg" /reemplazo = "Ser" /reemplazo = "Thr"
 /reemplazo = "Val" /reemplazo = "Trp" /reemplazo = "Tyr"

 <220>
 <221> variante
 <222> 16
 <223> /reemplazo = "Cys" /reemplazo = "Asp" /reemplazo = "Glu" /reemplazo = "Phe" /reemplazo = "Gly"
 /reemplazo = "His" /reemplazo = "Ile" /reemplazo = "Lys" /reemplazo = "Leu" /reemplazo = "Met" /reemplazo =
 35 "Asn" /reemplazo = "Pro" /reemplazo = "Gln" /reemplazo = "Arg" /reemplazo = "Ser" /reemplazo = "Thr"
 /reemplazo = "Val" /reemplazo = "Trp" /reemplazo = "Tyr"
 40
 <220>
 <221> variante
 <222> 17
 <223> /reemplazo = "Cys" /reemplazo = "Asp" /reemplazo = "Glu" /reemplazo = "Phe" /reemplazo = "Gly"
 reemplazo = "His" /reemplazo = "Ile" /reemplazo = "Lya" /reemplazo = "Leu" /reemplazo = "Met" /reemplazo =
 45 "Asn" /reemplazo = "Pro" /reemplazo = "Gln" /reemplazo = "Arg" /reemplazo = "Ser" /reemplazo = "Thr"
 /reemplazo = "Val" /reemplazo = "Trp" /reemplazo = "Tyr"

 <400> 1
 50

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Ala Ala Ala Ala Ala
1 5 10 15

Ala Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Thr
20 25 30

His Glu Tyr Glu Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45

Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

ES 2 583 832 T3

5
 <210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: bucle src recombinante"
 <400> 2

Ser Thr His Glu Tyr Glu
1 5

10
 <210> 3
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: 1L3-B9"
 20
 <400> 3

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Ala Asn His Gly Asn
1 5 10 15

Arg Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Thr
20 25 30

His Glu Tyr Glu Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45

Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

25
 <210> 4
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: 11L0-C6"
 30
 <400> 4

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Lys Gln Lys Gly His
1 5 10 15

Leu Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Thr
20 25 30

His Glu Tyr Glu Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45

Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

35
 <210> 5

ES 2 583 832 T3

<211> 64
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: 11L5-B06"

<400> 5

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Ser Ala Arg Gly Gln
1 5 10 15

Leu Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Thr
20 25 30

His Glu Tyr Glu Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45

Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

10

<210> 6
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: 11L6-F03"

20

<400> 6

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Asp Lys Leu Ser Ala
1 5 10 15

Leu Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Thr
20 25 30

His Glu Tyr Glu Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
35 40 45

Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
50 55 60

25

<210> 7
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: 11L9-C09"

<400> 7

ES 2 583 832 T3

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ser Val Ser Trp
 1 5 10 15

Ser Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Thr
 20 25 30

His Glu Tyr Glu Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45

Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 8
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: 11L10-A05"

<400> 8

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Ser Ser Arg Gly Val
 1 5 10 15

Leu Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Thr
 20 25 30

His Glu Tyr Glu Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45

Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 9
 <211> 64
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: 11L11-A09"

<400> 9

ES 2 583 832 T3

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Ser Arg Lys Ser Asn
 1 5 10 15

Leu Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Ser Thr
 20 25 30

His Glu Tyr Glu Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu
 35 40 45

Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Val Asp Ser Ile Gln
 50 55 60

<210> 10
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> IL-17A humana, incluyendo secuencia señal

<400> 10

Met Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu 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

Leu Gly Cys Ile Asn 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 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
 145 150 155

5

10

<210> 11
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cadena ligera de un anticuerpo anti-TNF"

10

<400> 11

```

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
    
```

<210> 12
<211> 451
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cadena pesada de un anticuerpo anti-TNF"

10

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: enlazador"

<400> 13

5

10

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

5 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: enlazador"
 <400> 14

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

15 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: enlazador"
 <400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

25 <210> 16
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cadena ligera de un anticuerpo anti-TNF/enlazador/11L5-B06"
 35 <400> 16

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

ES 2 583 832 T3

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr
 225 230 235 240

Ser Ala Arg Gly Gln Leu Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe
 245 250 255

Gln Ile Leu Ser Thr His Glu Tyr Glu Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser
 260 265 270

Leu Thr Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro
 275 280 285

Val Asp Ser Ile Gln
 290

<210> 17
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cadena ligera de un anticuerpo anti-TNF/enlazador/11L9-C09"

5

10

<400> 17

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr
 225 230 235 240

Glu Ser Val Ser Trp Ser Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe
 245 250 255

Gln Ile Leu Ser Thr His Glu Tyr Glu Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser
 260 265 270

Leu Thr Thr Gly Glu Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro
 275 280 285

Val Asp Ser Ile Gln
 290

5 <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: secuencia recombinante"
 <400> 18

Ser Thr His Glu Tyr Glu Asp
 1 5

15 <210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: bucle RT recombinante"
 <400> 19

Glu Ala Arg Thr Glu Asp
 1 5

25 <210> 20
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 20

Gly Val Thr Leu Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu Ala Arg Thr Glu
 1 5 10 15

Asp Asp Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Lys Phe Gln Ile Leu Asn Ser
 20 25 30

Ser Glu Gly Asp Trp Trp Glu Ala Arg Ser Leu Thr Thr Gly Glu Thr
 35 40 45

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

35

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que inhibe la actividad de IL-17A glucosilada, en el que el polipéptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- 5 (a) GVTLFVALYDY(X¹)(X²)(X³)(X⁴)(X⁵)(X⁶)DLSFHKGEKFKQLSTHEYEDWWEARSLTTGET QYIPSNYVAPVDSIQ (SEQ ID NO: 1),
en el que las posiciones de los aminoácidos (X¹) a (X⁶) puede ser cualquier secuencia de aminoácidos; y
10 (b) una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de (a), en la que la determinación de la identidad excluye las posiciones de los aminoácidos (X¹) a (X⁶) y siempre que la secuencia de aminoácidos STHEYE (SEQ ID NO: 2) en las posiciones de los aminoácidos 31 a 36 de la SEQ ID NO: 1 se conserve.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que
- 15 (X¹) es A, K, S, D o E;
(X²) es N, Q, A, K, S o R;
(X³) es H, K, R, L o V;
(X⁴) es G o S;
20 (X⁵) es H, Q, A, W, V o N; y
(X⁶) es R, L o S.
3. El polipéptido de la reivindicación 1 o 2, en el que el polipéptido comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una cualquiera de las SEQ ID NO 3 a 9.
- 25 4. Una construcción de fusión que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, fusionado a un compuesto adicional.
5. La construcción de fusión de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el compuesto adicional es un compuesto farmacéuticamente activo, un profármaco, un transportador farmacéuticamente activo, un compuesto activo desde el punto de vista del diagnóstico, un potenciador de la penetración celular y/o un compuesto que modula la semivida sérica.
- 30 6. La construcción de fusión de la reivindicación 4, en la que el compuesto adicional se selecciona del grupo que consiste en
- 35 (a) un colorante fluorescente,
(b) un fotosensibilizador,
(c) un radionúclido,
(d) un agente de contraste para imaginología médica,
40 (e) una citoquina,
(f) un compuesto tóxico,
(g) una quimioquina,
(h) un factor procoagulante,
(i) una enzima para la activación de profármacos,
45 (j) un aglutinante de albúmina,
(k) una albúmina,
(l) un aglutinante de IgG, y
(m) polietilenglicol.
- 50 7. La construcción de fusión de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el compuesto adicional consiste en o comprende una cadena ligera de anticuerpo, una cadena pesada de anticuerpo, un dominio F_c de un anticuerpo, un anticuerpo, o una combinación de los mismos.
8. La construcción de fusión de la reivindicación 7, en la que el compuesto adicional consiste en o comprende un anticuerpo que se une específicamente a TNF α .
- 55 9. La construcción de fusión de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 está ubicado aguas abajo del extremo C de dicho compuesto adicional.
- 60 10. La construcción de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 o 9, en la que el compuesto adicional comprende o consiste en una cadena ligera de anticuerpo que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 11.
- 65 11. Una construcción que comprende o que consiste en al menos una copia, preferentemente dos copias de la construcción de fusión de la reivindicación 10 y al menos una copia, preferentemente dos copias de la cadena pesada de anticuerpo de la SEQ ID NO: 12.

12. La construcción de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la construcción comprende o consiste en al menos una copia, preferentemente dos copias de una construcción de fusión que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 16 y al menos una copia, preferentemente dos copias, de la cadena pesada de anticuerpo de la SEQ ID NO: 12.

5 13. La construcción de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la construcción comprende o consiste en al menos una copia, preferentemente dos copias de una construcción de fusión que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 17 y al menos una copia, preferentemente dos copias, de la cadena pesada de anticuerpo de la SEQ ID NO: 12.

10 14. La construcción de acuerdo con la reivindicación 12, en la que la construcción comprende o consiste en dos copias de una construcción de fusión que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 16 y dos copias de la cadena pesada de anticuerpo de la SEQ ID NO: 12.

15 15. La construcción de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la construcción comprende o consiste en dos copias de una construcción de fusión que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 17 y dos copias de la cadena pesada de anticuerpo de la SEQ ID NO: 12.

20 16. Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la construcción de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, o una o más moléculas de ácido nucleico que codifican la construcción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15.

25 17. Una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, la construcción de fusión de la reivindicación 4 a 10, la construcción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 16, o cualquier combinación de los mismos.

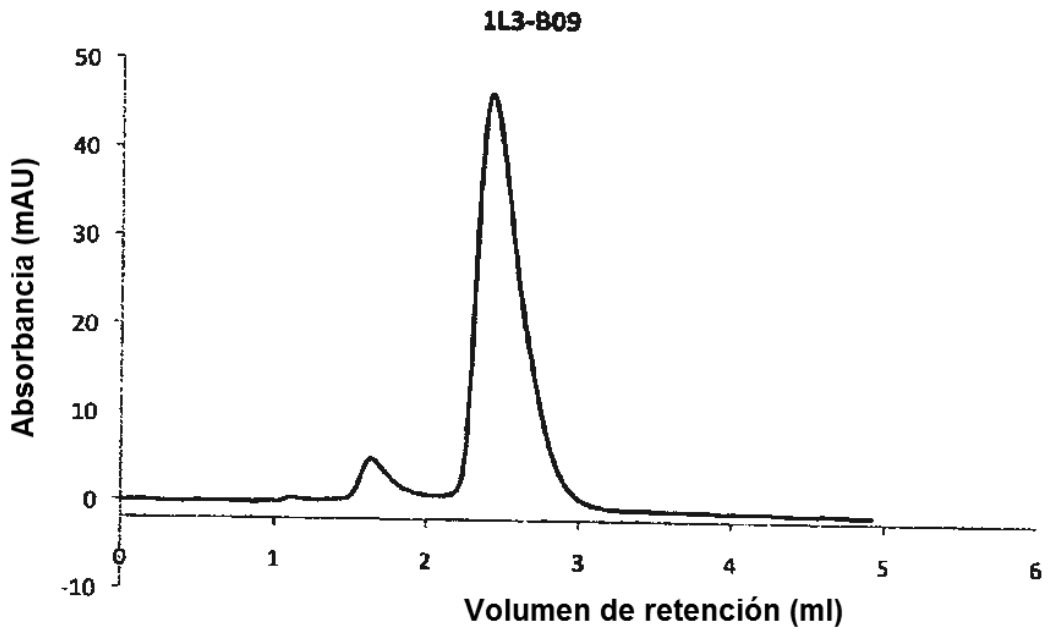
30 18. La composición farmacéutica de la reivindicación 17, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, autoinmunitaria y/o relacionada con la pérdida ósea.

35 19. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en la que la enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en artritis, preferentemente artritis reumatoide, artritis crónica progresiva, artritis reactiva, artritis soriásica, artritis enteropática y artritis deformante, enfermedades reumáticas, espondiloartropatías, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, hipersensibilidad (incluyendo tanto hipersensibilidad de las vías respiratorias como hipersensibilidad dérmica), alergias, lupus eritematoso sistémico, trastornos musculares inflamatorios, policondritis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, dermatomiositis, síndrome de Steven-Johnson, hepatitis activa crónica, miastenia grave, psoriasis, esprue idiopático, enfermedad intestinal inflamatoria autoinmunitaria, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, síndrome de intestino irritable, oftalmopatía endocrina, enfermedad de Graves, sarcoidosis, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, diabetes juvenil (diabetes mellitus tipo I), trastornos hematológicos autoinmunes, anemia hemolítica, anemia aplásica, anemia pura de glóbulos rojos, trombocitopenia idiopática, uveitis (anterior y posterior), queratoconjuntivitis seca, queratoconjuntivitis vernal, fibrosis pulmonar intersticial, glomerulonefritis (con y sin síndrome nefrótico), síndrome nefrótico idiopático o nefropatía de cambios mínimos, tumores, enfermedad inflamatoria de la piel, inflamación de la córnea, miositis, aflojamiento de implantes óseos, trastornos metabólicos, aterosclerosis, diabetes y dislipidemia, pérdida ósea, artrosis, osteoporosis, enfermedad periodontal, enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias, asma, bronquitis, neumoconiosis, enfisema pulmonar, reacciones inflamatorias agudas e hiperagudas, infecciones agudas, choque séptico, choque endotóxico, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, meningitis, neumonía, quemaduras graves, síndrome debilitante de caquexia, ictus, queratitis estromal herpética y enfermedad del ojo seco.

50

Figura 1

A



B

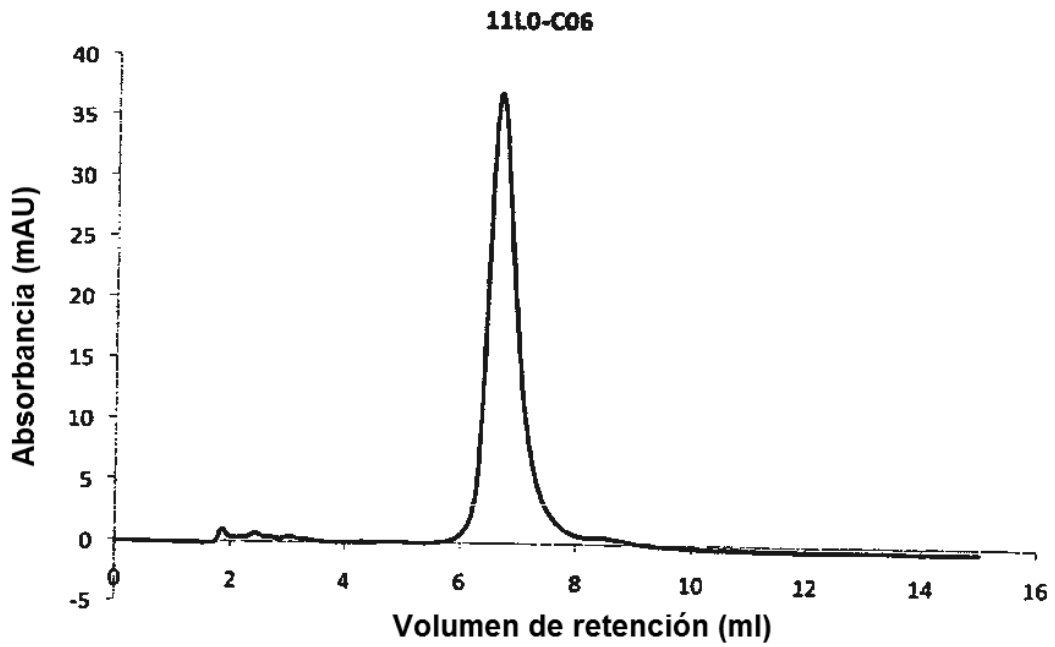
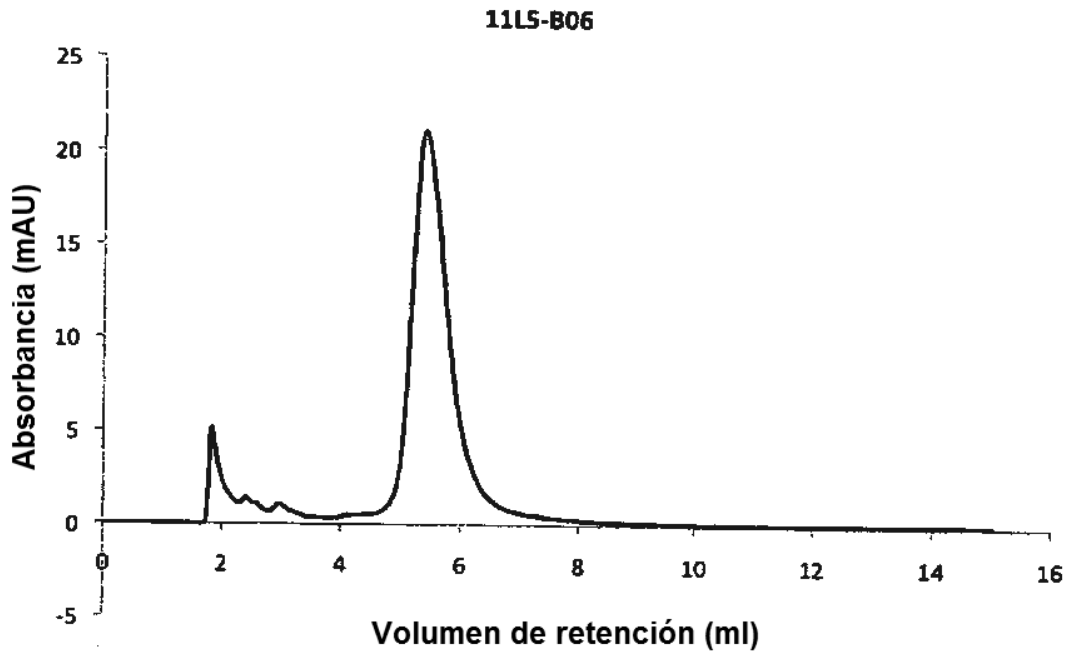


Figura 1 continuación

C



D

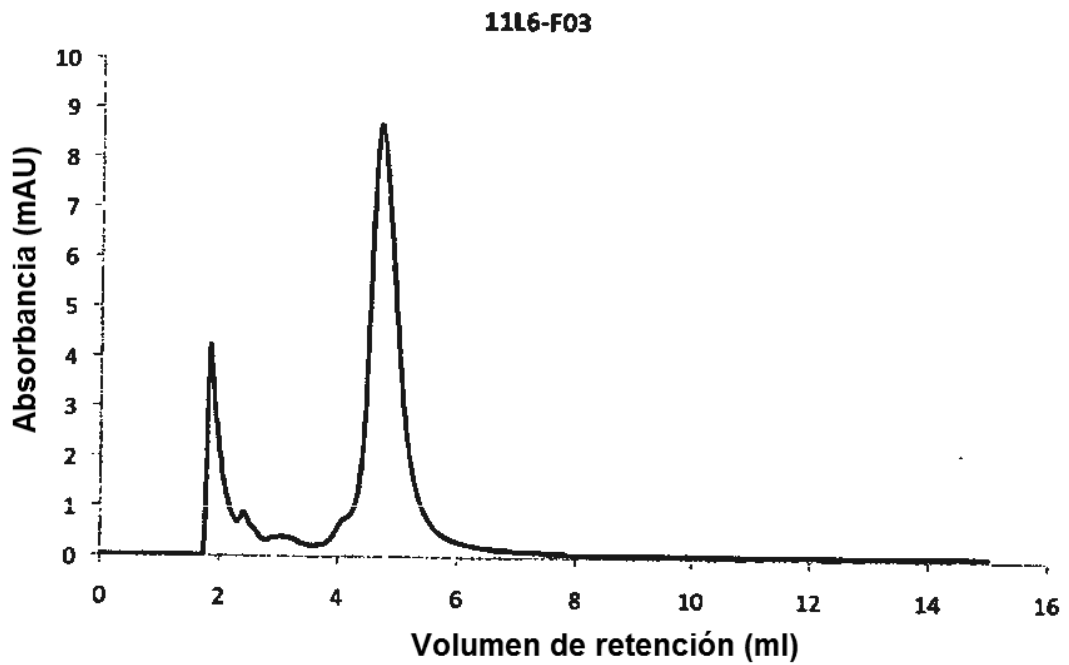
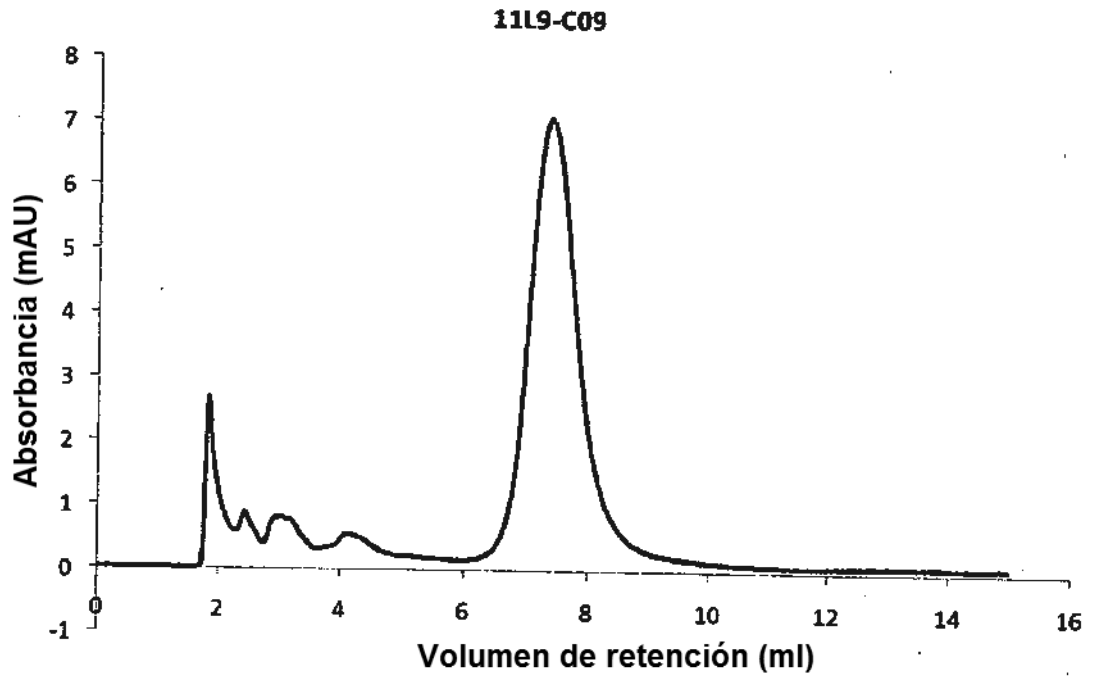


Figura 1 continuación

E



F

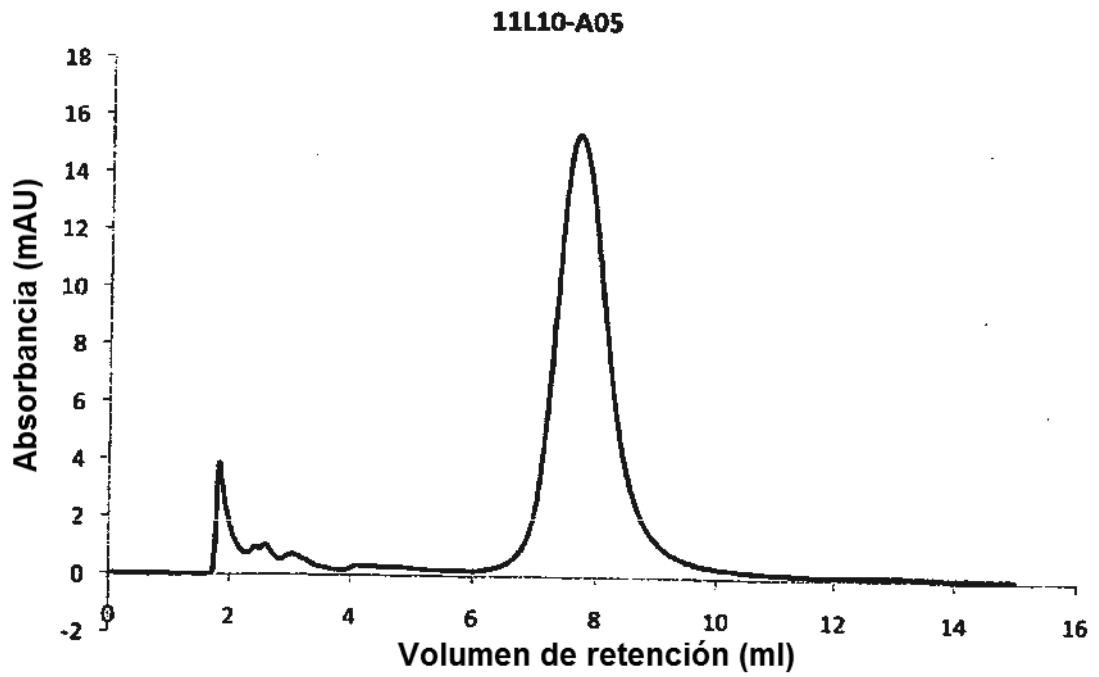


Figura 1 continuación

G

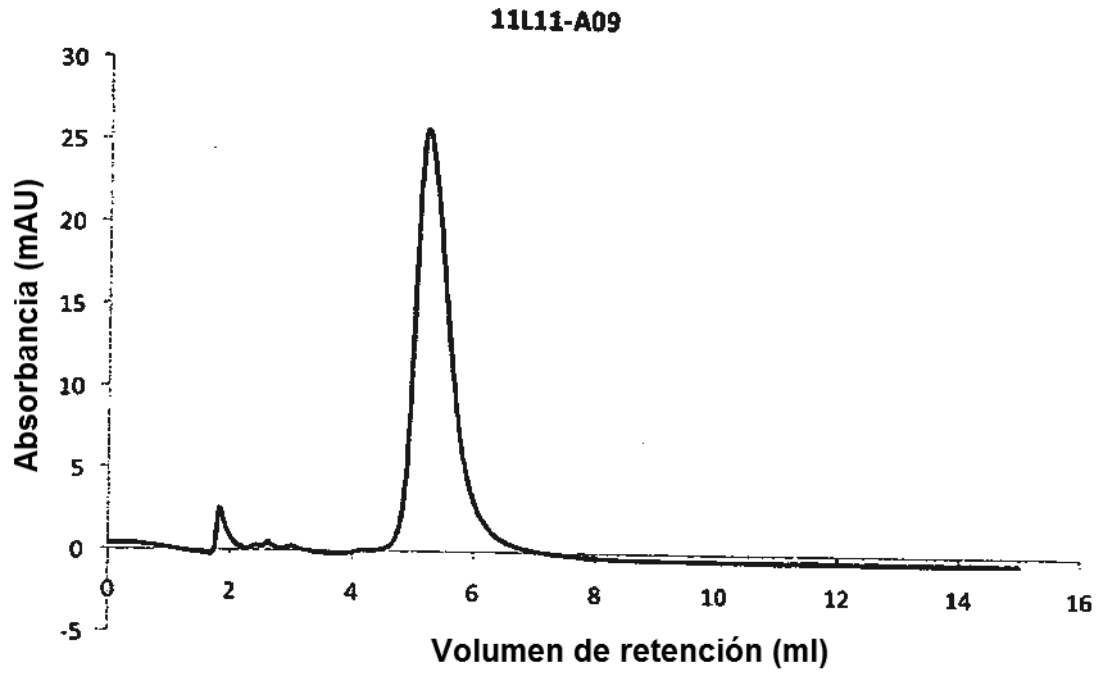


Figura 2

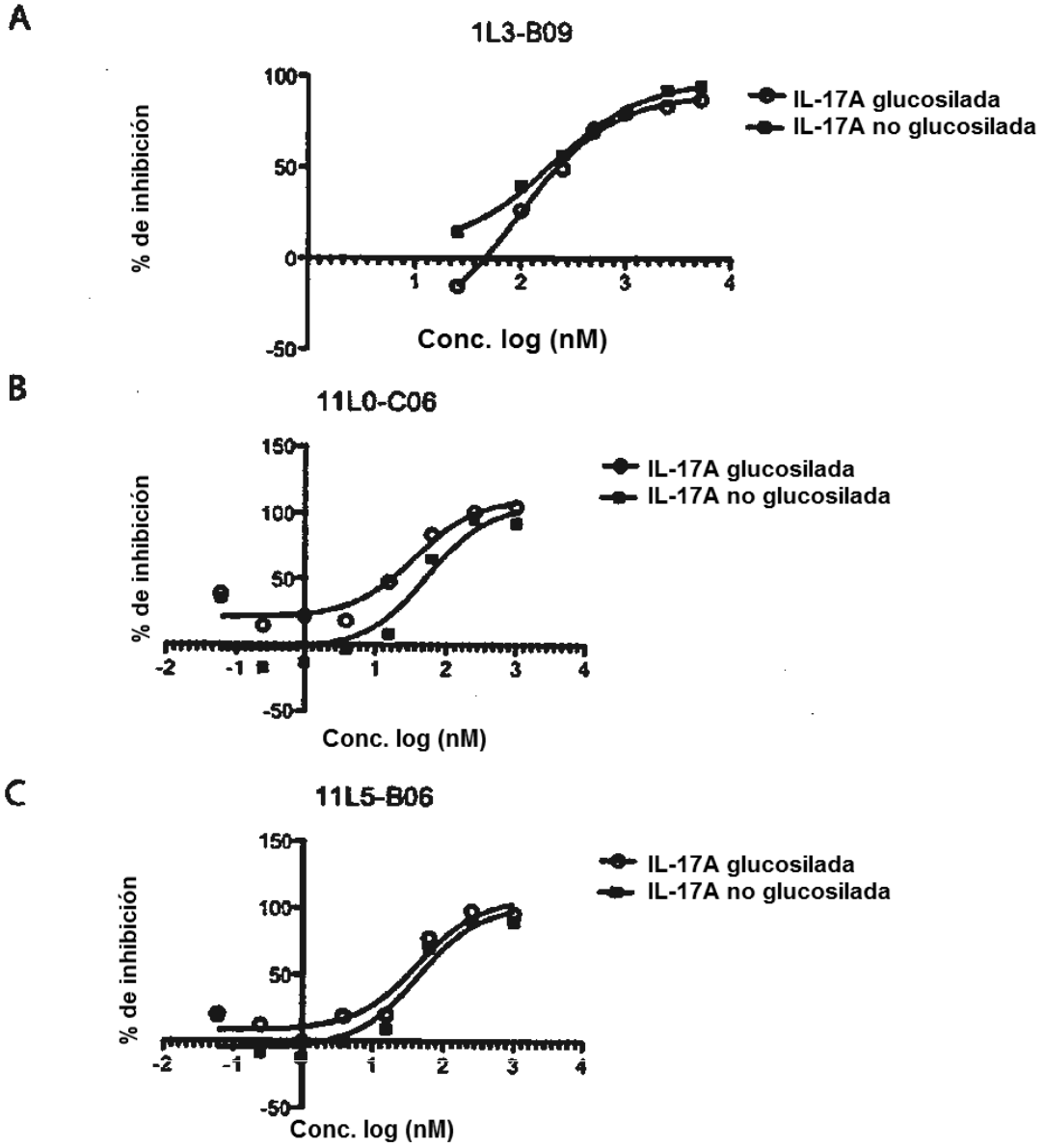


Figura 2 continuación

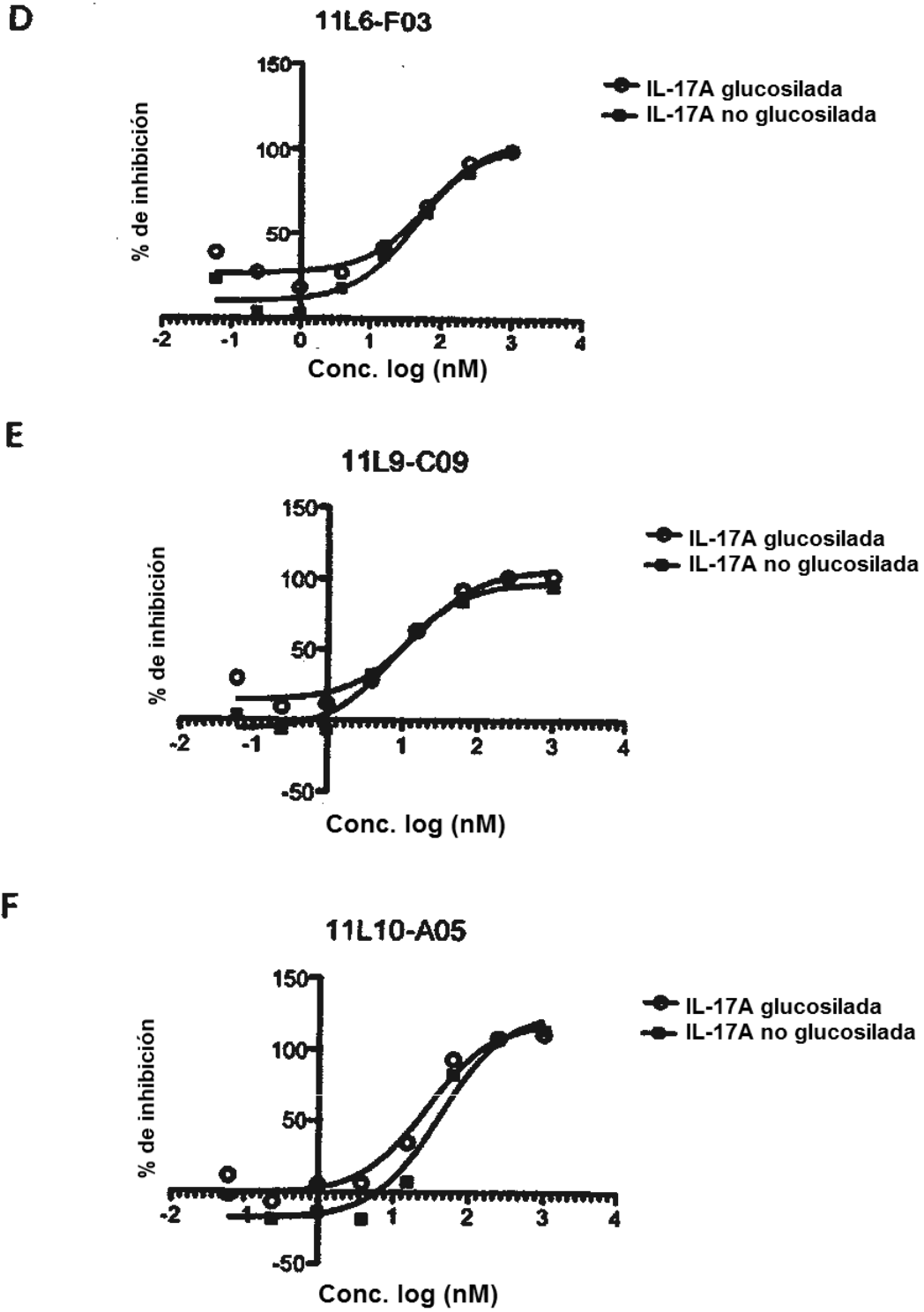
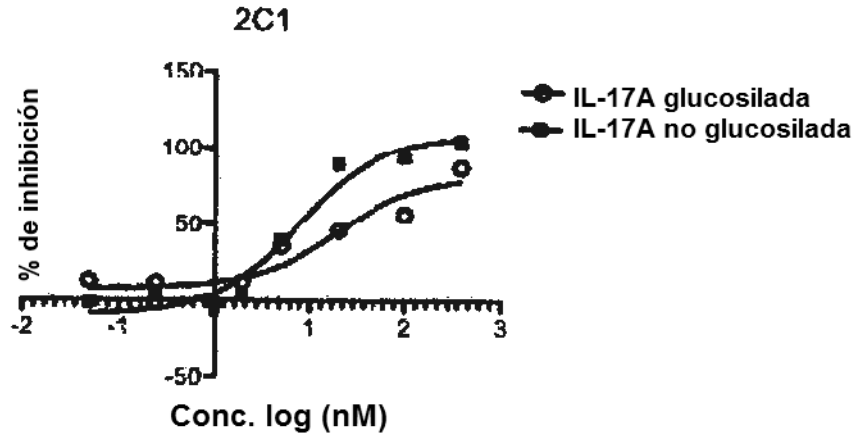
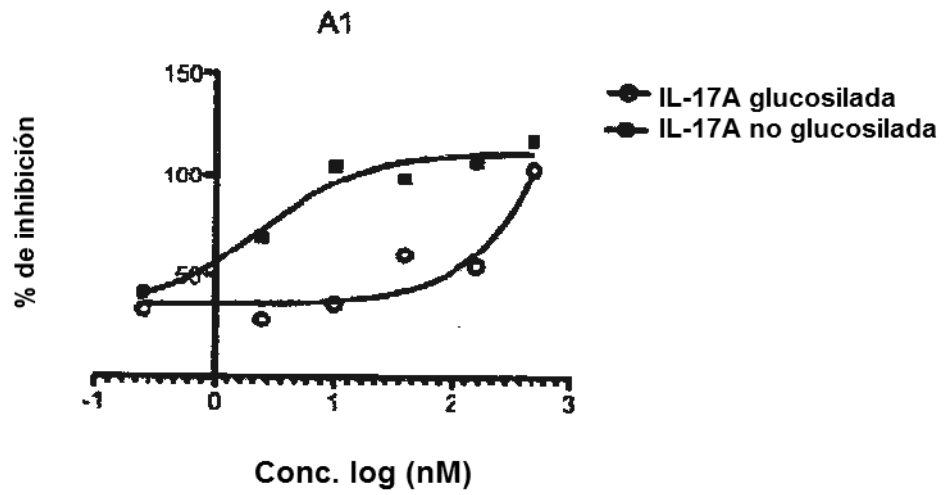


Figura 3

A



B



C

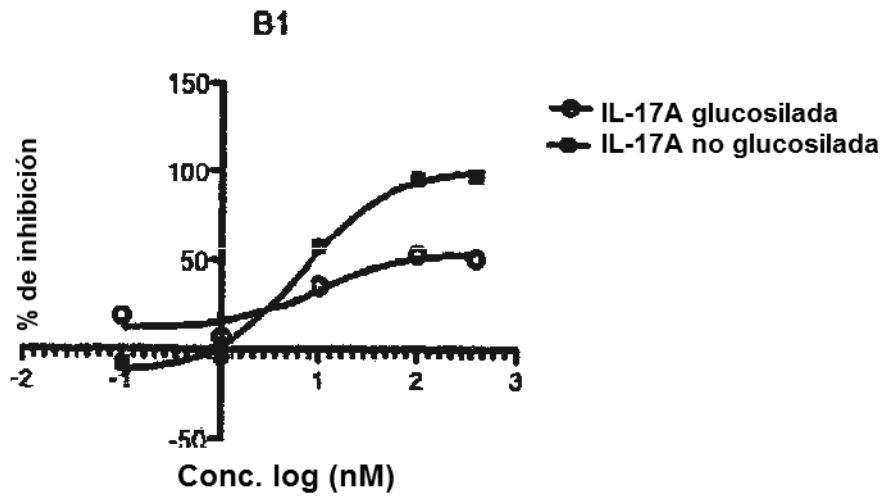


Figura 4

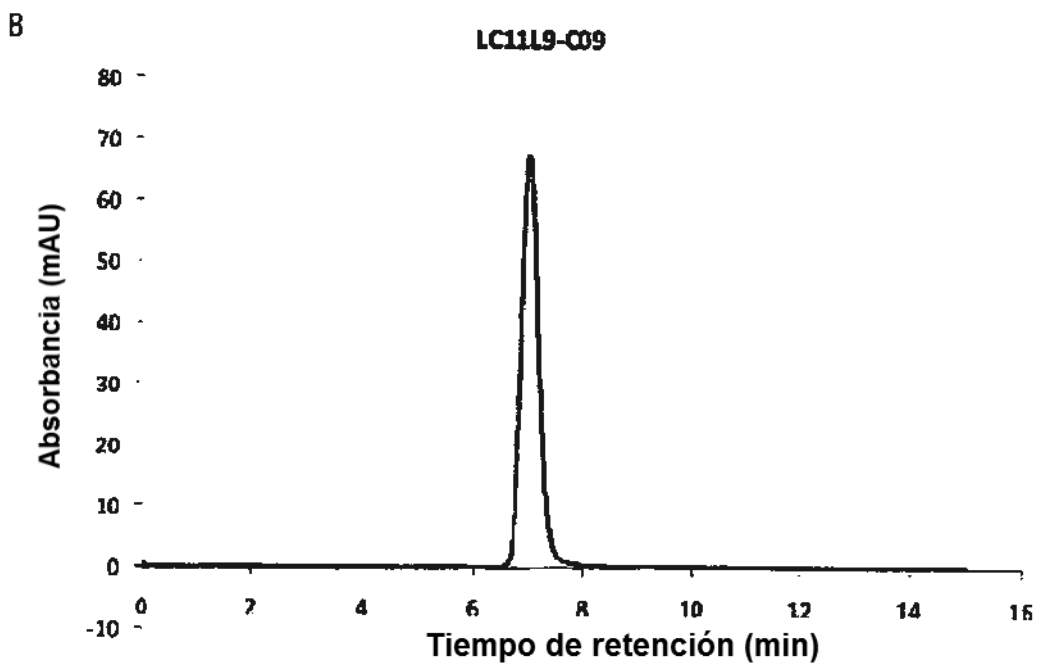
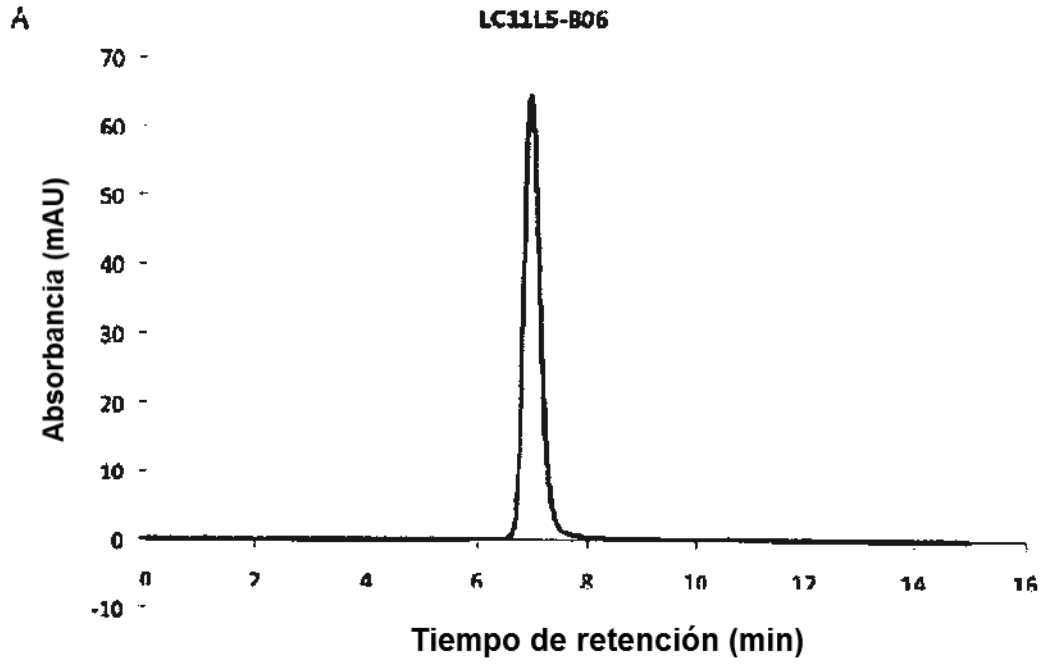
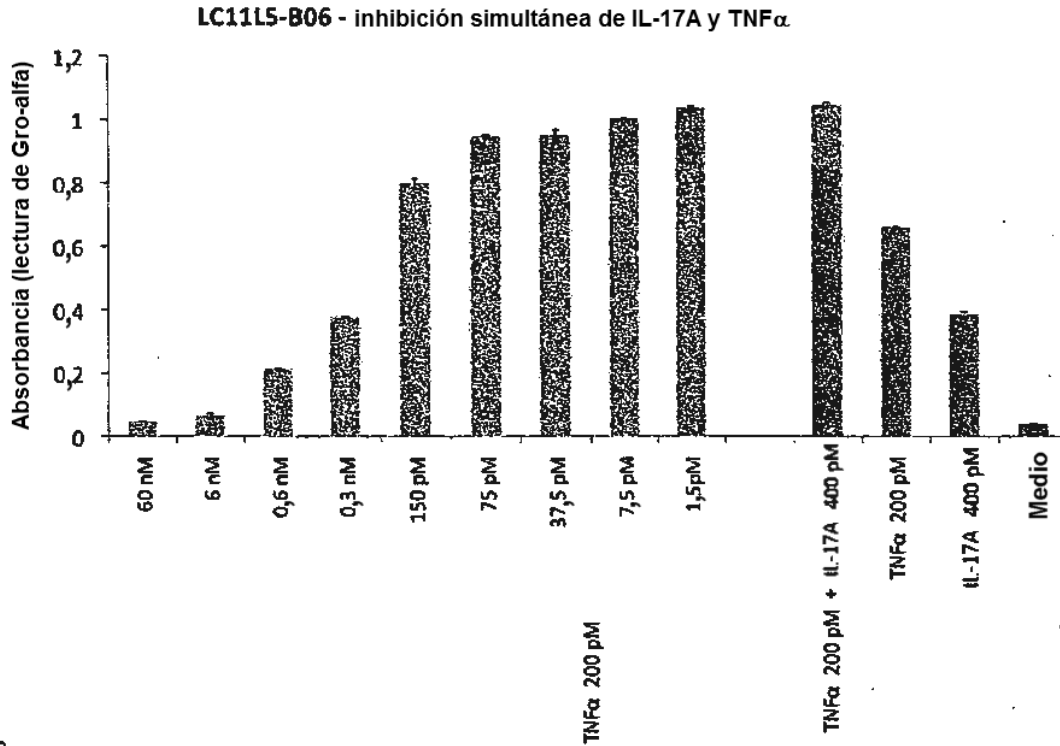


Figura 5

A



B

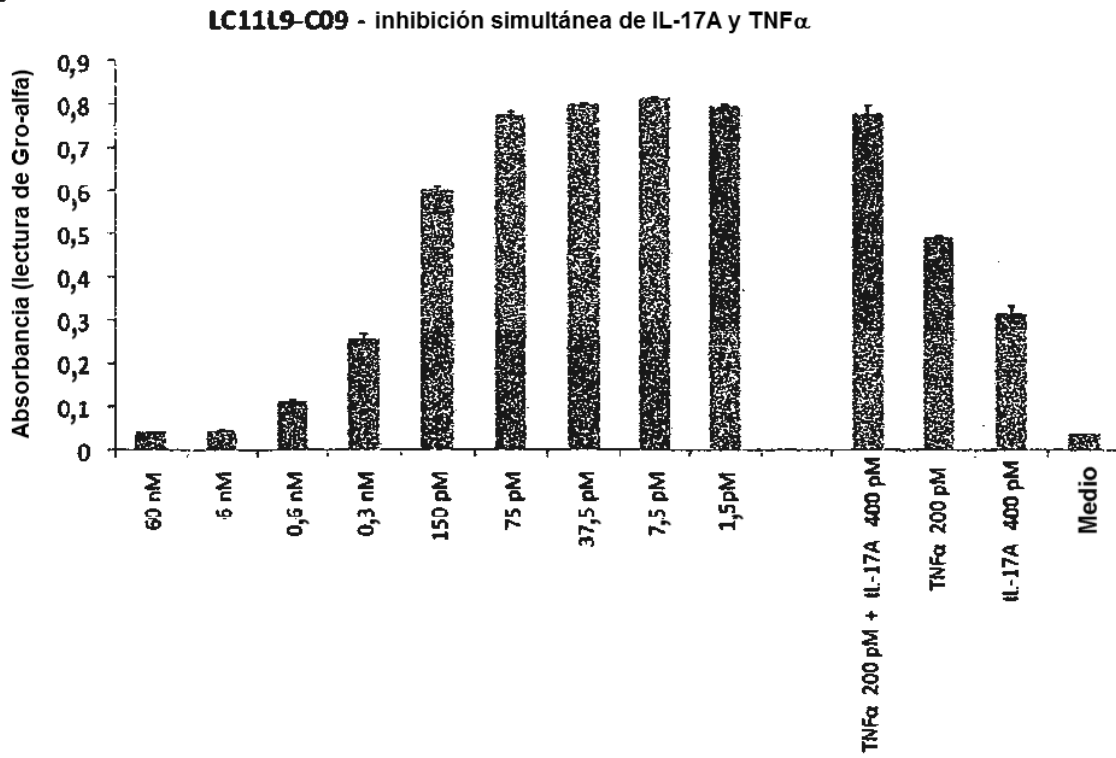


Figura 6

A

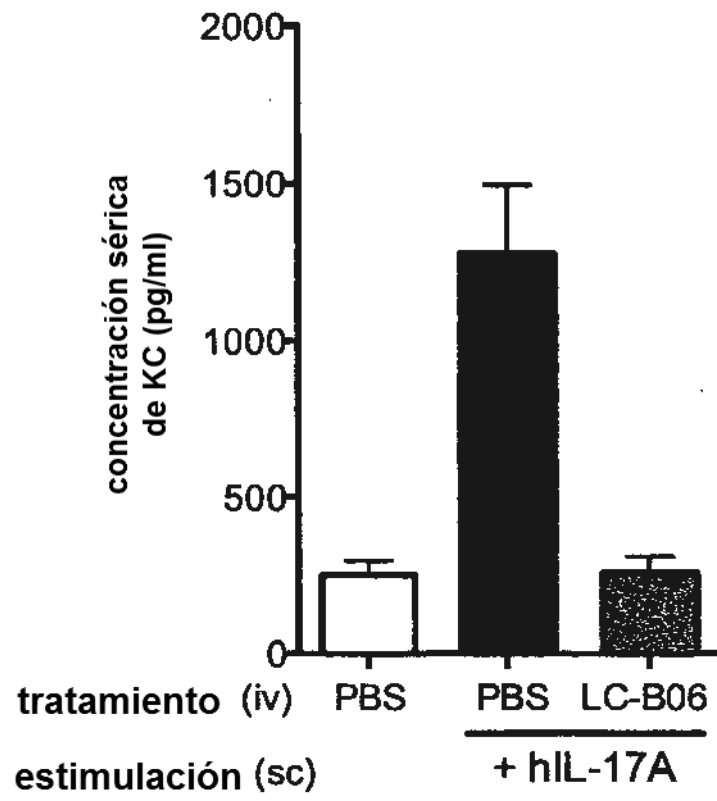


Figura 6 continuación

B

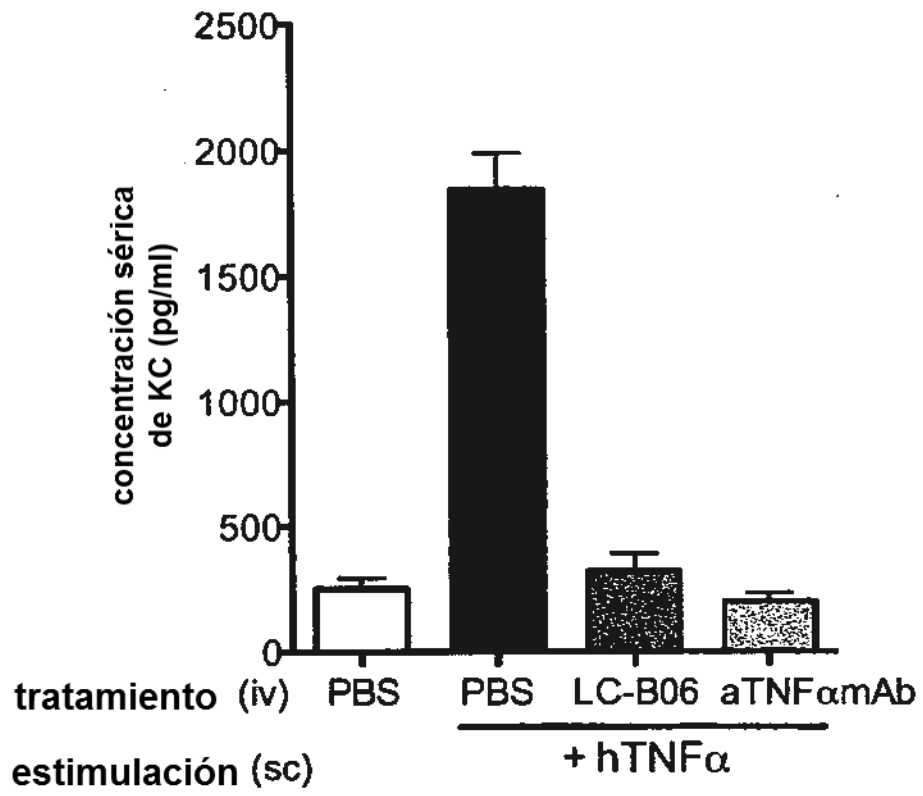


Figura 6 - continuación

c

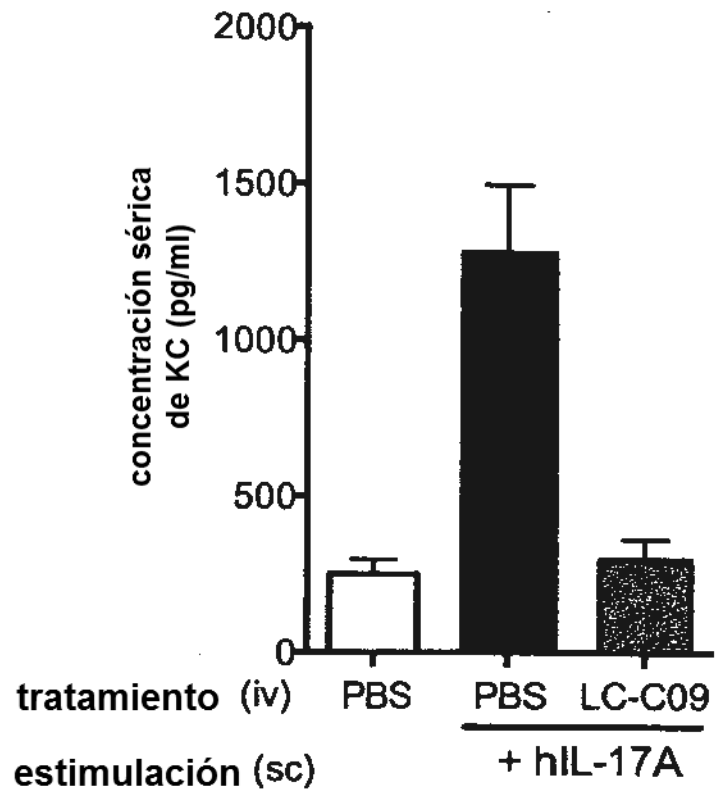


Figura 6 - continuación
D

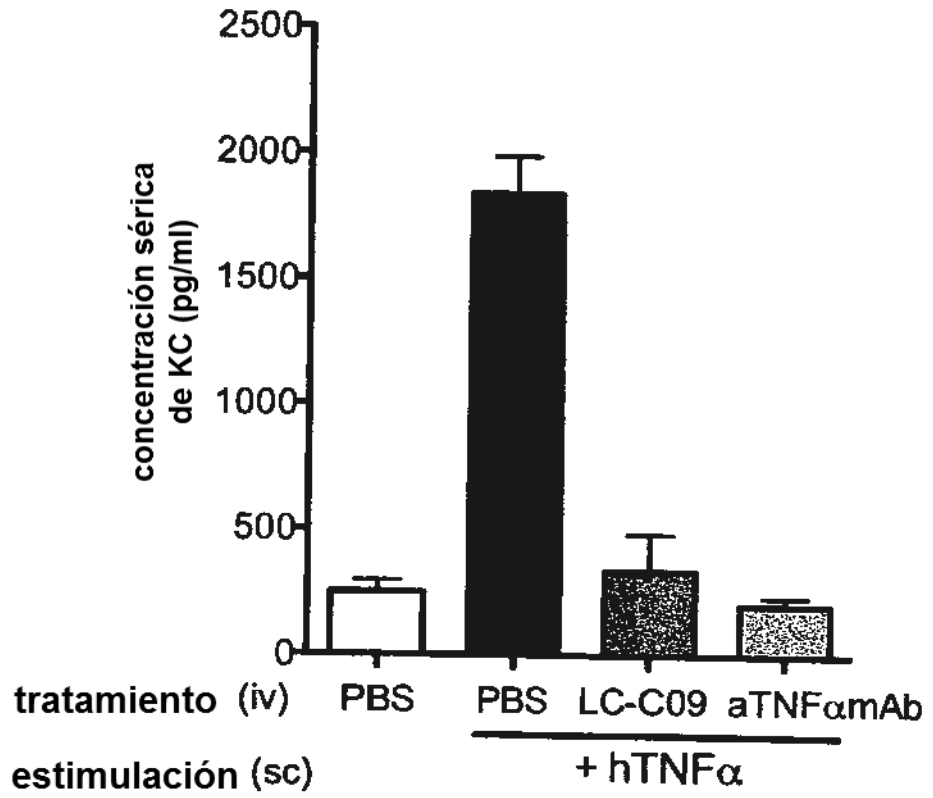
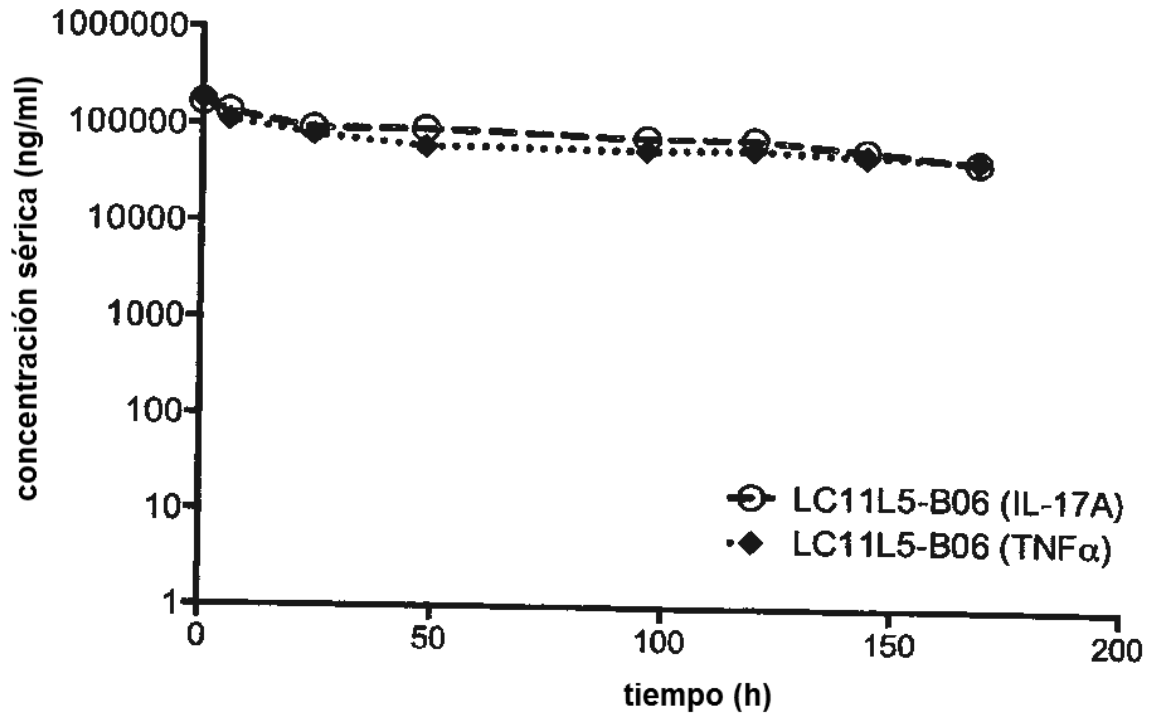


Figura 7

A



B

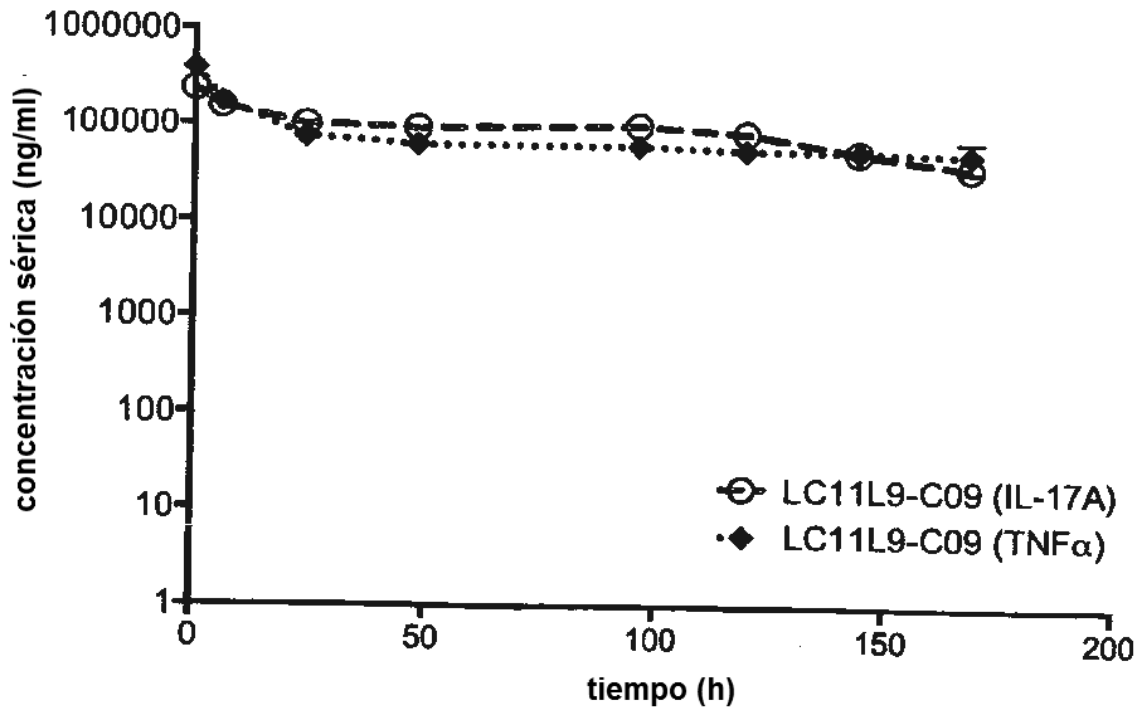


Figura 8

```

                10      20      30      40
FynSH3wt (SEQ ID NO: 20) GVTLFVALYDYEARTEDDLSFHKGEKFQILNSSE-GDWWE
1L3-B9 (SEQ ID NO: 3) GVTLFVALYDYANHGNRDLSFHKGEKFQILSTHEYEDWWE
11L0-C6 (SEQ ID NO: 4) GVTLFVALYDYKQKGHLDLSFHKGEKFQILSTHEYEDWWE
11L5-B06 (SEQ ID NO: 5) GVTLFVALYDYSARGQLDLSFHKGEKFQILSTHEYEDWWE
11L6-F03 (SEQ ID NO: 6) GVTLFVALYDYDKLSALDLSFHKGEKFQILSTHEYEDWWE
11L9-C09 (SEQ ID NO: 7) GVTLFVALYDYESVSWSDLSFHKGEKFQILSTHEYEDWWE
11L10-A05 (SEQ ID NO: 8) GVTLFVALYDYSSRGVLDLSFHKGEKFQILSTHEYEDWWE
11L11-A09 (SEQ ID NO: 9) GVTLFVALYDYSRKSNDLSFHKGEKFQILSTHEYEDWWE
                *****
                *****
                *  ****

                50      60
FynSH3wt (SEQ ID NO: 20) ARSLTTGETGYIPSNYVAPVDSIQ
1L3-B9 (SEQ ID NO: 3) ARSLTTGETGYIPSNYVAPVDSIQ
11L0-C6 (SEQ ID NO: 4) ARSLTTGETGYIPSNYVAPVDSIQ
11L5-B06 (SEQ ID NO: 5) ARSLTTGETGYIPSNYVAPVDSIQ
11L6-F03 (SEQ ID NO: 6) ARSLTTGETGYIPSNYVAPVDSIQ
11L9-C09 (SEQ ID NO: 7) ARSLTTGETGYIPSNYVAPVDSIQ
11L10-A05 (SEQ ID NO: 8) ARSLTTGETGYIPSNYVAPVDSIQ
11L11-A09 (SEQ ID NO: 9) ARSLTTGETGYIPSNYVAPVDSIQ
                *****
    
```

Figura 9

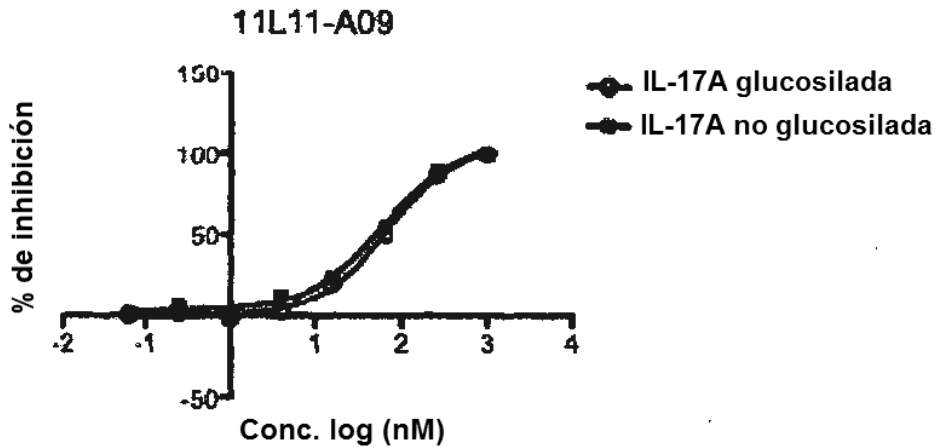


Figura 10

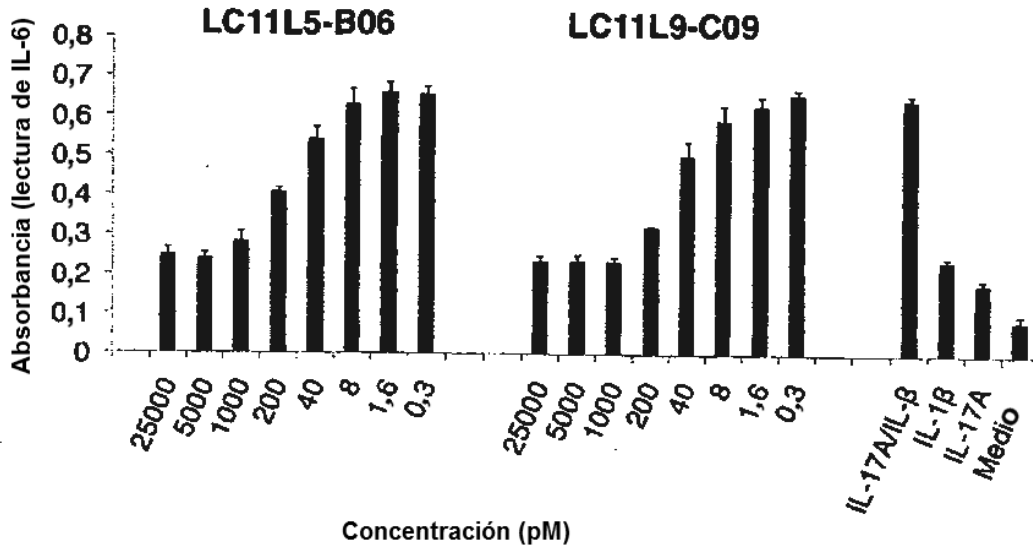


Figura 11

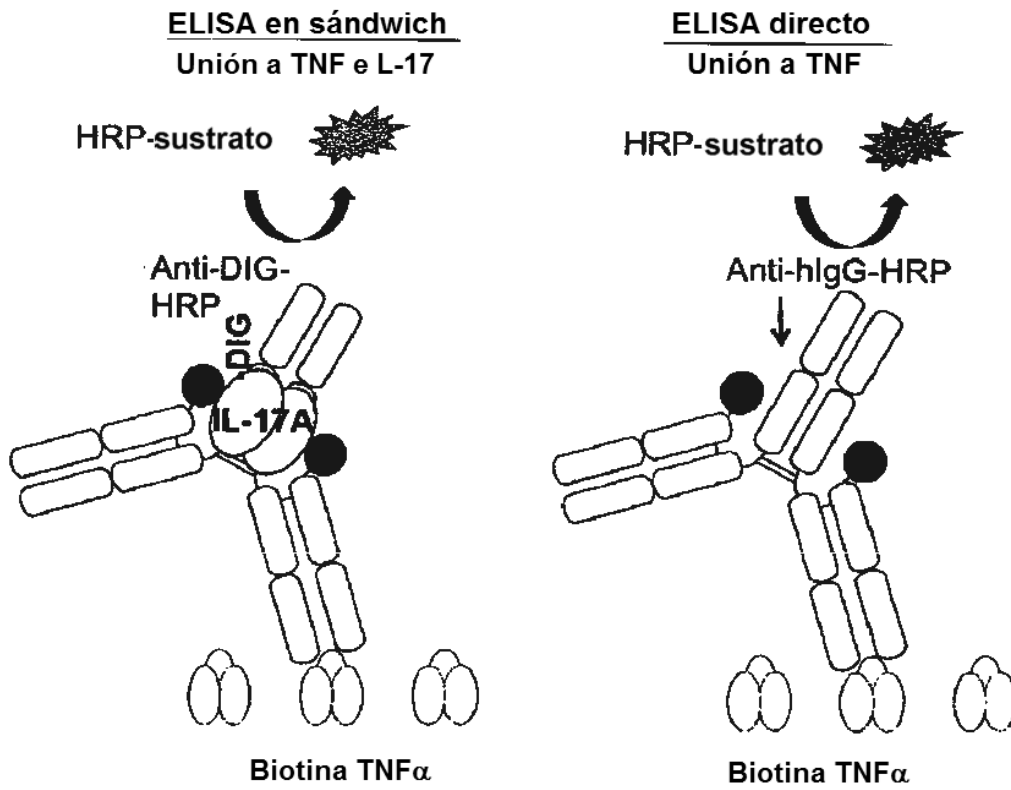
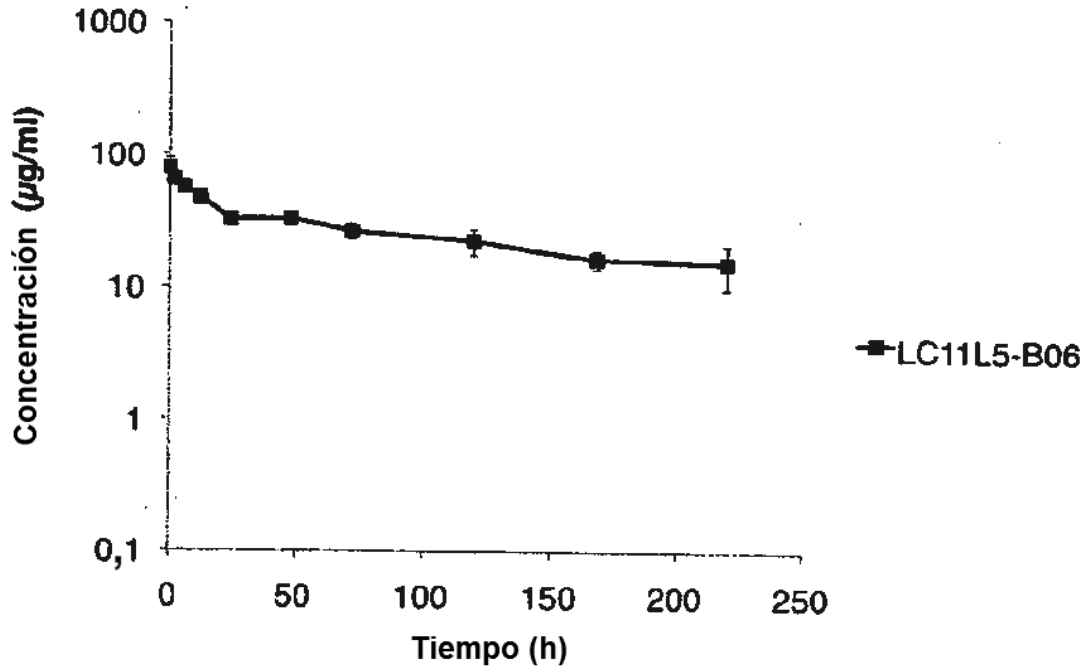


Figura 12

A



B

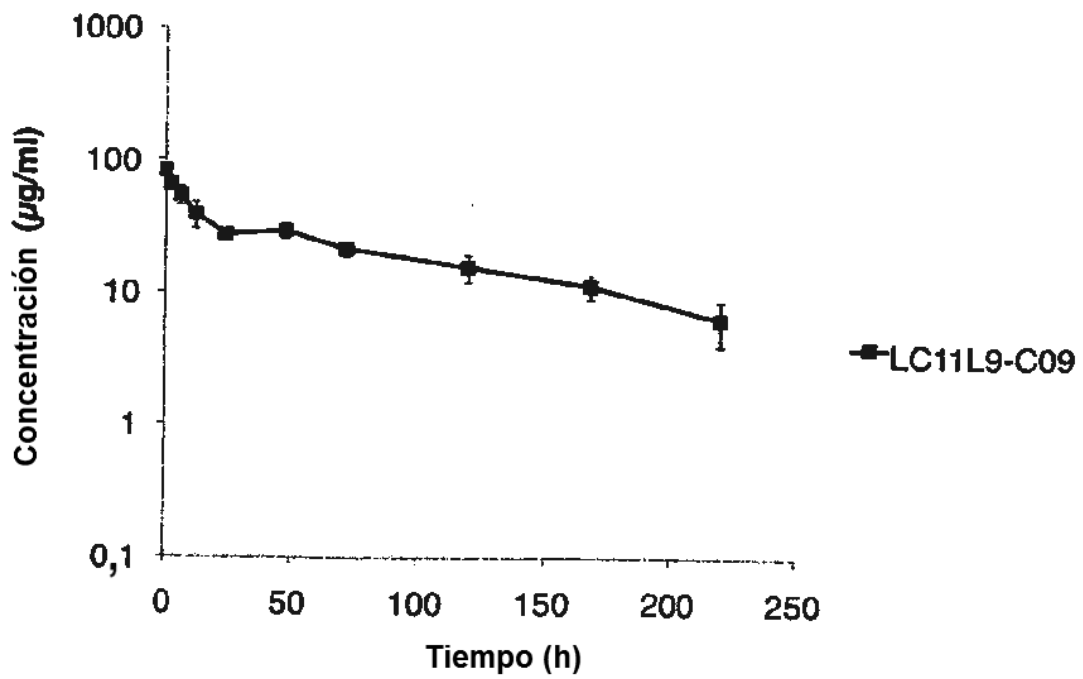
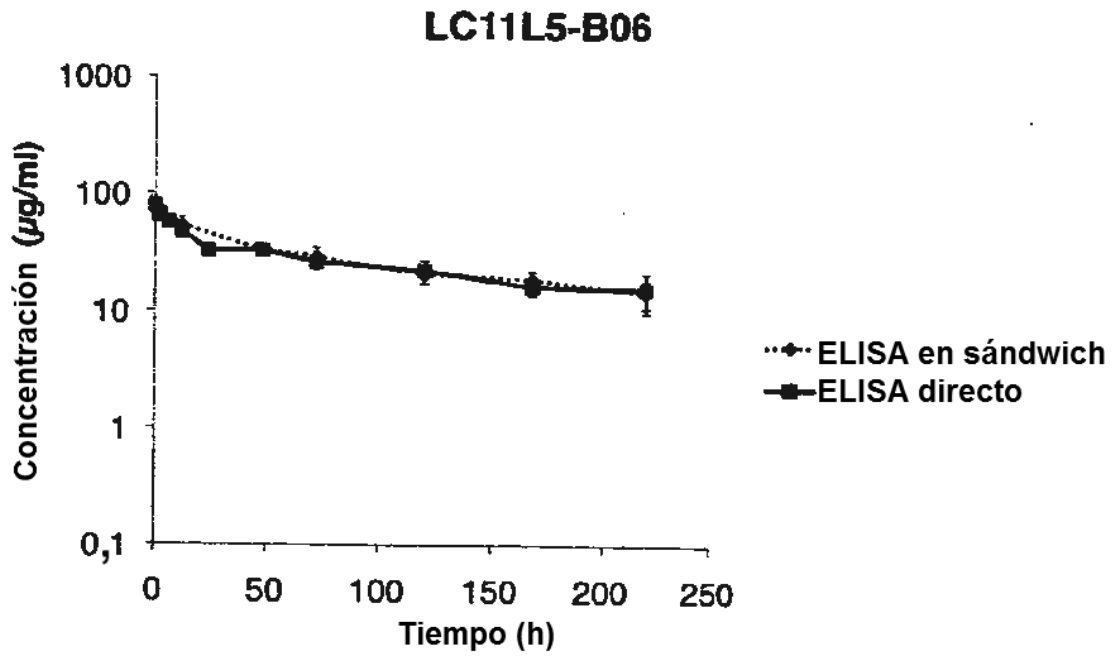


Figura 13

A



B

