

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 115**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2010 PCT/US2010/054662**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.05.2011 WO11053763**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2010 E 10827516 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 2493506**

54 Título: **Antagonistas de IL-17A**

30 Prioridad:

30.10.2009 US 256862 P

05.03.2010 US 310919 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.10.2019

73 Titular/es:

JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US

72 Inventor/es:

NASO, MICHAEL;
SWEET, RAYMOND;
LUO, JINQUAN;
WU, SHENG-JIUN;
ELLOSO, MERLE;
DUCATA, DANIELA, DELLA;
RAUCHENBERGER, ROBERT;
RUTZ, MARK;
ALMAGRO, JUAN, CARLOS;
TAUDTE, SUSANN;
WU, BINGYUAN;
OBMOLOVA, GALINA y
MALIA, THOMAS

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 728 115 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

Antagonistas de IL-17A

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a antagonistas de anticuerpos de interleucina-17A (IL-17A), a polinucleótidos que codifican antagonistas de anticuerpos de IL-17A o fragmentos de los mismos y a procedimientos para fabricar y usar los anteriores.

10

Antecedentes de la invención

La interleucina-17A (IL-17A, CTLA-8, IL-17) es una citocina secretada por células Th17 activadas, linfocitos T CD8⁺, linfocitos T $\gamma\delta$ y células NK en respuesta a citocinas como IL-23 y TGF- β , y regula la producción de mediadores como péptidos antimicrobianos (defensinas), citocinas proinflamatorias y quimiocinas de múltiples tipos de células como fibroblastos y sinoviocitos están involucrados en la biología de los neutrófilos, la inflamación, la destrucción de órganos y la defensa del huésped (revisado en Weaver y col., Annu. Rev. Immunol. 25: 821-52, 2007; Aggarwal et al., J. Biol. Chem. 278: 1910-4, 2003; Mangan et al., Nature 441: 231-4, 2006). La IL-17A se sinergiza con otras citocinas, como el TNF- α y la IL-1 β , para potenciar el ambiente proinflamatorio.

20

La familia de citocinas IL-17A consta de seis homólogos designados IL-17A, B, C, D, E y F, cada uno con funciones biológicas divergentes y distintos (Kawaguchi y col., J. Allergy Clin. Immunol. 114: 1265-73, 2004; Kolls y Linden, Inmunidad 21: 467-76, 2004; Moseley et al., Cytokine Growth Factor Rev. 14: 155-74, 2003). De los miembros de la familia, la IL-17F es la más homóloga a la IL-17A y comparte muchas propiedades funcionales similares, como la inducción de neutrofilia en el pulmón y la inducción de citocinas proinflamatorias; sin embargo, en el hombre, la IL-17F es aproximadamente 10 veces menos potente que la IL-17A (Moseley et al., Cytokine Growth Factor Rev. 14: 155-74, 2003; Kolls et al., Immunity, 21: 467-76, 2004; McAllister y col., J. Immunol. 175: 404-12, 2005). IL-17A e IL-17F también pueden formar heterodímeros, que tienen bioactividad intermedia *in vitro* (Wright y col., J. Biol. Chem. 282: 13447-55, 2007).

30

La IL-17A media sus efectos al interactuar con el receptor A de interleucina-17 (IL-17RA) y el receptor C (IL-17RC) (Moseley et al., Cytokine Growth Factor Rev. 14: 155-74, 2003; Toy et al., J. Immunol. 177: 36-9, 2006). IL-17F señala a través de los mismos receptores, aunque la afinidad de IL-17F por los receptores es significativamente menor (Kuestner y col., J. Immunol. 179: 5462-73, 2007). Las estructuras cristalinas del IL-17F humano y el complejo IL-17F/IL-17RA humano identificaron una supuesta cavidad de unión al receptor en el homodímero IL-17F (Hymowitz et al., EMBO J. 20: 5332-41, 2001; Ely et al., Nat. Immunology 10: 1245-51, 2009). Se identificó una cavidad similar en la estructura cristalina de la IL-17A humana en complejo con un Fab neutralizante, aunque la cavidad estaba parcialmente ocupada (Gerhardt y col., J. Mol. Biol. 394: 905-21, 2009).

35

La producción inadecuada o excesiva de IL-17A está asociada con la patología de diversas enfermedades y trastornos, incluidas artritis reumatoide (Lubberts, Cytokine 41: 84-91, 2008), hipersensibilidad de las vías respiratorias, incluyendo la enfermedad alérgica de las vías respiratorias, como el asma (revisada en Linden, Curr. Opin. Investig. Drugs. 4: 1304-12, 2003; Ivanov, Trends Pharmacol. Sci. 30: 95-103, 2009), psoriasis (Johansen et al., Br. J. Dermatol. 160: 319-24, 2009), hipersensibilidad dérmica, incluyendo dermatitis atópica (Toda y col., J. Allergy Clin. Immunol. 111: 875-81, 2003), esclerosis sistémica (Fujimoto y col., J. Dermatolog. Sci. 50: 240-42, 2008), enfermedades inflamatorias del intestino, incluyendo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn (Holttá et al., Inflamm. Bowel Dis. 14: 1175-84, 2008; Zhang et al., Inflamm. Intestino dis. 12: 382-88, 2006), y enfermedades pulmonares, incluida la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Curtis y col., Proc. A.m. Thorac. Soc. 4: 512-21, 2007).

50

Se han propuesto anticuerpos para IL-17A para su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por IL-17A (Publicaciones PCT N.º WO09/082624, WO08/021156, WO07/070750, WO07/149032, WO06/054059, WO06/013107, WO08/001063, WO10/034443; Solicitudes de patente de EE.UU. N.º US2008/095775, US2009/0175881).

55

También se han descrito anticuerpos contra otros componentes del sistema inmunitario, como IL-23, CTLA-4 e interferón gamma (Publicación PCT N.º WO07/076524; solicitudes de patente de EE.UU. N.º US2002/086014 y US2003/099647 respectivamente).

60

La sustitución de aminoácidos en una región CDR puede afectar a las propiedades de especificidad y afinidad de unión (Panka et al., Proc. Natl Acad Sci. 85: 3080-84, 1988; Rudikoff y col., Proc. Natl Acad Sci. 79: 1979-83, 1982).

65

Como la farmacocinética, la eficacia y los perfiles de seguridad de las terapias de anticuerpos dependerán de composiciones específicas, existe la necesidad de anticuerpos mejorados contra la IL-17A humana que sean adecuados para su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos mediados por la IL-17A.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1. A-H. Secuencias de CDR de los antagonistas de los anticuerpos IL-17A de las familias 2, 6a, 6b, 19a y 19b.

5 Fig. 2. De ejemplo A) IGLV3 e IGLJ; y B) genes de la línea germinal IGHV3 e IGHJ como armazones para injertar residuos de paratopo. La secuencia de mAb6785 se muestra arriba. Las regiones CDR están subrayadas y los sitios de contacto centrales en la cadena ligera mAb6785 (Y31, D49, Y90, F92, F93) y la cadena pesada (S52, T54, F57, Y59, Q99, L100 y T101) se indican con un asterisco "*". 4 regiones marco en B) presentan subrayado doble. La secuencia mostrada es * 01 alelos a menos que se indique específicamente lo contrario.

10 Fig. 3. Numeración de Kabat y Chotia para las cadenas A) ligeras y B) pesadas de determinados anticuerpos. Las ubicaciones de las CDR Kabat y HV Chothia se resaltan en gris.

15 Fig. 4. Ensayos de unión competitiva de A) y B) mAb1926 marcados; C) mAb317; D) mAb3171; E) y F) mAb7357 con IL-17A en un formato ELISA.

Fig. 5. A) Mapas de intercambio H/D de IL-17A en complejo con diferentes mAb anti-IL-17A. La numeración sobre los bloques protectores corresponde a la numeración de secuencia IL-17A (SEQ ID NO: 105) madura.

20 Fig. 6. A) La estructura molecular global del complejo IL-17A/Fab6468. El dímero de IL-17A se muestra gris oscuro y gris claro. Las dos moléculas Fab se muestran en gris oscuro y gris claro, respectivamente; B) Comparación de monómero de IL-17A (gris claro) e IL-17F (gris oscuro); C) Dímero de IL-17A (gris claro y oscuro); D) Dímero de IL-17F (gris claro y oscuro).

25 Fig. 7. Los dos sitios de unión y el epítipo central en IL-17A para Fab6468. Los protómeros 1 y 2 son gris oscuro y claro, respectivamente. El epítipo central está indicado por el óvalo negro. La línea discontinua representa residuos desordenados.

30 Fig. 8. Comparación de los bolsillos de unión del receptor putativo IL-17A e IL-17F. A) Vistas frontal y posterior de los bolsillos P1 y P2 de IL-17A. El motivo FF de la cadena ligera CDB3 mAb6468 se muestra en el bolsillo P2. B) IL-17F con motivo FF N-terminal en el bolsillo P2. C) Alineación de secuencias de IL-17A e IL-17F y la conservación de las bolsas P1 y P2.

35 Fig. 9. Especificidad de unión de mAb1926 a diferentes especies de proteínas IL-17A en un formato ELISA.

Sumario de la invención

40 Un aspecto de la invención es un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que comprende una VH y una VL, en el que el anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos HCDR1, HCDR2 y HCDR3 como se muestra en las SEQ ID NO: 25, 43 y 60, respectivamente, y la LCDR1, Las secuencias de aminoácidos de LCDR2 y LCDR3 como se muestra en las SEQ ID NO: 3, 6 y 18, respectivamente.

45 Un aspecto de la divulgación es un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, en el que el anticuerpo se une específicamente a IL-17A humana que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 105 en los residuos de aminoácidos 56-68 (SEQ ID NO: 157) y 100 116 (SEQ ID NO: 158); o en los residuos L26, R55, E57, P59, E60, R61, Y62, S64, V65, W67, R101, E102, P103 y F110.

50 Otro aspecto de la divulgación es un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, en el que el anticuerpo se une específicamente a una cavidad de bolsillo P2 en IL-17A humana, la cavidad de bolsillo P2 que comprende los residuos de aminoácidos V22, V24, L26, 128, Y62, L99, R101, F110 y L112 de la SEQ ID NO: 105.

55 Otro aspecto de la divulgación es un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a IL-17A humana que compite por la unión de IL-17A humana con un anticuerpo monoclonal que comprende las secuencias de aminoácidos de ciertas regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR) 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3), las secuencias de aminoácidos de ciertas regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (CDR) 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3), las secuencias de aminoácidos de ciertas regiones variables de la cadena pesada (VH) o Las secuencias de aminoácidos de ciertas regiones variables de cadena ligera (VL).

60 Otro aspecto de la divulgación es un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a la IL-17A humana, que comprende ciertos residuos de aminoácidos del paratopo de la región variable de la cadena pesada y ciertos residuos de aminoácidos del paratopo de la región variable de la cadena ligera que interactúan con ciertos residuos de la IL-17A humana que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 105.

65 Otro aspecto de la divulgación es un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a la IL-17A humana, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en el que el

anticuerpo comprende un paratopo de región variable de cadena pesada seleccionado de los residuos de Chothia F56 y Y58 ; y un paratopo de región variable de cadena ligera seleccionado de los residuos Y91, F93 y F94 de Chothia.

5 Otro aspecto de la divulgación es un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a IL-17A humana, que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), en el que el anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de ciertas cadenas pesadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2, HCDR3), las secuencias de aminoácidos de ciertos reigones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (CDR) 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2, LCDR3), las
10 secuencias de aminoácidos de ciertas regiones variables de cadena pesada (VH) o las secuencias de aminoácidos de ciertas regiones variables de cadena ligera (VL).

Otro aspecto de la divulgación es un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a IL-17A humana, en el que el anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de ciertas cadenas pesadas y las secuencias de
15 aminoácidos de ciertas cadenas ligeras.

Un aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo aislado o fragmento de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Un aspecto de la divulgación es una cadena pesada de anticuerpo aislado que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 67, 68, 69, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100.

Otro aspecto de la divulgación es una cadena ligera de anticuerpo aislado que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 87, 88, 89, 90 o 91.
25

Otro aspecto de la divulgación es un polinucleótido aislado que codifica una cadena pesada de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 67, 68, 69, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 92, 93, 94, 95, , 96, 97, 98, 99 o 100.

30 Otro aspecto de la divulgación es un polinucleótido aislado que codifica una cadena ligera de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 76, 77, 78, 79, 80, 87, 88, 89, 90 o 91.

Un aspecto de la invención es un polinucleótido aislado que codifica un anticuerpo de la invención.

35 Otro aspecto de la invención es un vector que comprende al menos un polinucleótido de la invención.

Otro aspecto de la invención es una célula huésped que comprende el vector de la invención.

40 Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento para inhibir la interacción de IL-17A humana con IL-17RA que comprende: proporcionar una IL-17A e IL-17RA humanos; y poner en contacto la IL-17A humana con un antagonista que se une a la IL-17A humana en al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en V22, V24, L26, 128, Y62, L99, R101, F110 y L112.

45 Otro aspecto de la divulgación es un procedimiento para inhibir la actividad biológica de IL-17A, que comprende: proporcionar una IL-17A e IL-17RA; y poner en contacto la IL-17A humana con un antagonista que se une al IL-17A humana en al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en V22, V24, L26, 128, Y62, L99, R101, F110 y L112.

50 Otro aspecto de la invención es un procedimiento para tratar una afección inflamatoria que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo aislado de la invención, o composición farmacéutica de la invención, a un paciente que lo necesite durante un tiempo suficiente para tratar la afección inflamatoria.

Descripción detallada de la invención

55 Debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares y no pretende ser limitante. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que se refiere la invención.

60 Aunque cualquier procedimiento y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica para probar la presente invención, en el presente documento se describen materiales y procedimientos de ejemplo. Al describir y aplicar la presente invención, se utilizará la siguiente terminología.

65 El término "antagonista" como se usa en el presente documento significa una molécula que inhibe parcial o completamente, mediante cualquier mecanismo, la actividad de IL-17A. Los antagonistas de ejemplo son anticuerpos, proteínas de fusión, péptidos, peptidomiméticos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos y moléculas

pequeñas. El agente puede identificarse utilizando ensayos bien conocidos para la actividad de IL-17A que se describe a continuación.

- 5 El término "antagonista del anticuerpo de IL-17A" o un "anticuerpo reactivo con IL-17A" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo que es capaz de, directa o indirectamente, reducir o inhibir la actividad biológica de IL-17A, bloqueando la unión de IL-17A a su receptor, o inhibidor de la activación del receptor IL-17A. por ejemplo, un anticuerpo reactivo con IL-17A puede unirse directamente a IL-17A y neutralizar la actividad de IL-17A, es decir, bloquear la señalización de IL-17A para reducir la liberación de citocinas y quimiocinas.
- 10 El término "IL-17A" (CTLA-8, IL-17, interleucina-17A) se refiere a un polipéptido IL-17A humana que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en GenBank Acc. No. NP_002181. La SEQ ID NO: 105 muestra la secuencia de aminoácidos de la IL-17A humana madura. IL-17A *in vivo* forma homodímeros de dos monómeros, que se denominan monómero A y monómero B, o protómero A y protómero B, o protómero 1 y protómero 2, o cadena A y cadena B. IL-17A también puede formar un heterodímero con IL-17F. El término "IL-17A" comprende las formas de monómero, homodímero y heterodímero. El término "IL-17Amut6" se refiere a una variante de IL-17A que tiene las sustituciones A70Q y A132Q. La secuencia de aminoácidos del IL-17Amut6 madura se muestra en la SEQ ID NO: 106, y la secuencia de cDNA en la SEQ ID NO: 112. IL-17A y IL-17Amut6 tienen actividades similares (solicitud de patente PCT n.ºWO09/003096).
- 15
- 20 La expresión "receptor de IL-17A" como se usa en el presente documento comprende ambos polipéptidos de receptor, IL-17RA (n.º de acceso en GenBank: NP_055154, SEQ ID NO: 107) e IL-17RC (N.º de acceso en GenBank: NP_703191, SEQ ID NO: 113), y Homodímeros o heterodímeros de los dos polipéptidos.
- 25 El término "anticuerpos" como se usa en el presente documento se entiende en un sentido amplio e incluye moléculas de inmunoglobulina que incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales que incluyen anticuerpos monoclonales murinos, humanos, humanos, adaptados a humanos, quiméricos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de al menos dos anticuerpos, anticuerpos diméricos, tetraméricos o multiméricos.
- 30 La expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) como se usa en el presente documento significa un anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, por lo general se dirigen contra un solo epítipo. El modificador "monoclonal" indica el carácter sustancialmente homogéneo del anticuerpo y no requiere la producción del anticuerpo por ningún procedimiento en particular.
- 35 Las inmunoglobulinas se pueden asignar a cinco clases principales, a saber, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de la cadena pesada. IgA e IgG se subclasifican aún más como los isotipos IgA₁IgA₂IgG₁IgG₂IgG₃ e IgG₄. Las cadenas ligeras de anticuerpos de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, a saber, kappa (κ) y lambda (λ), en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.
- 40 La expresión "fragmentos de anticuerpo" comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, como una región determinante de complementariedad de cadena pesada (HCDR), una región determinante de complementariedad de cadena ligera (LCDR), una región variable de cadena pesada (VH), una cadena ligera región variable (VL), una región constante de la cadena pesada (CH), una región constante de la cadena ligera (CL), o una región marco (FR) de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Un anticuerpo puede ser un Fab, F (ab'), F (ab')₂, scFv, dsFv, o diabody. Las estructuras de los fragmentos de anticuerpos mencionados anteriormente, y las técnicas para la preparación y uso de los anticuerpos y fragmentos de los mismos son bien conocidas en la técnica.
- 45 Una región variable de anticuerpo consiste en una región "marco" interrumpida por tres "sitios de unión a antígeno". Los sitios de unión al antígeno se definen utilizando varios términos: (i) Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR), tres en el VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y tres en el VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), se basan en la variabilidad de secuencia (Wu y Kabat, J. Exp. Med. 132:211-250, 1970; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991).
- 50 (ii) "Regiones hipervariables", "HVR" o "HV", tres en VH (H1, H2, H3) y tres en VL (L1, L2, L3), se refieren a las regiones de dominios variables de un anticuerpo que tienen una estructura hipervariable como la definen Chothia y Lesk (Chothia y Lesk, Mol. Biol. 196: 901-917, 1987). Otros términos incluyen "IMGT-CDR" (Lefranc et al., Dev. Comparat Immunol. 27: 55-77, 2003) y "Uso de residuos determinantes de la especificidad" (SDRU) (Almagro, Mol. Recognit. 17:132-143, 2004). La base de datos de ImMunoGeneTics (IMGT) internacional (<http://www.imgt.org>) proporciona una numeración y definición estandarizadas de los sitios de unión a antígenos. La correspondencia entre CDR, HV y delimitaciones IMGT se describe en Lefranc et al., Dev. Comparat Immunol. 27: 55-77, 2003.
- 55
- 60 Los "residuos de Chothia", como se usan en el presente documento, son los anticuerpos VL y VH numerados de acuerdo con Al-Lazikani (Al-Lazikani y col., J. Mol. Biol. 273: 927-48, 1997). Correspondencia entre los dos sistemas de numeración más utilizados, Kabat (Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health
- 65

Service, NIH, Bethesda, MD, 1991) y Chothia (Chothia y Lesk, Mol. Biol. 196: 901-17, 1987) en relación con la numeración de polipéptidos secuencial se muestra en la Figura 3 para ejemplos de anticuerpos de la invención.

5 "Marco" o "secuencias marco" son las secuencias restantes de una región variable distinta de las definidas como sitio de unión a antígeno. Debido a que el sitio de unión al antígeno se puede definir por varios términos como se describió anteriormente, la secuencia exacta de aminoácidos de un marco depende de cómo se definió el sitio de unión al antígeno.

10 La expresión "sustancialmente idéntico" como se usa en el presente documento significa que las dos secuencias de aminoácidos del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo que se comparan son idénticas o tienen "diferencias insustanciales". Las diferencias importantes son sustituciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que no son adversas afectan las propiedades de los anticuerpos. Las secuencias de aminoácidos sustancialmente idénticas a las secuencias descritas en el presente documento también forman parte de esta solicitud. En algunas realizaciones, la
15 identidad de secuencia puede ser aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o superior. El porcentaje de identidad se puede determinar, por ejemplo, mediante la alineación por pares utilizando la configuración predeterminada del módulo AlignX de Vector NTI v.9.0.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las secuencias de proteínas de la presente invención se pueden usar como una secuencia de consulta para realizar una búsqueda en bases de datos públicas o de patentes para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Los programas de
20 ejemplo utilizados para realizar dichas búsquedas son los programas XBLAST o BLASTP ([http _ // www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), o la suite GenomeQuest™ (GenomeQuest, Westborough, MA) que utiliza la configuración predeterminada.

25 La expresión "en combinación con" como se usa en el presente documento significa que los agentes descritos pueden administrarse a un animal juntos en una mezcla, simultáneamente como agentes individuales o secuencialmente como agentes individuales en cualquier orden.

30 La expresión "afección inflamatoria", como se usa en el presente documento, se refiere a respuestas sistémicas o localizadas agudas o crónicas a estímulos dañinos, como patógenos, células dañadas, lesiones físicas o irritantes, que están mediadas en parte por la actividad de citocinas, quimiocinas o células inflamatorias. (por ejemplo, neutrófilos, monocitos, linfocitos, macrófagos) y se caracteriza en la mayoría de los casos por dolor, enrojecimiento, hinchazón y deterioro de la función del tejido.

35 La expresión "afección inflamatoria mediada por IL-17A" como se usa en el presente documento se refiere a una afección inflamatoria que resulta al menos parcialmente de la actividad biológica de IL-17A, o causada por la actividad de IL-17A. Las afecciones inflamatorias mediadas por IL-17A de ejemplo son la psoriasis y la artritis reumatoide.

40 La expresión "afección mediada por IL-17A" como se usa en el presente documento abarca todas las enfermedades y afecciones médicas en las que IL-17A desempeña un papel, ya sea directa o indirectamente, en la enfermedad o afección médica, incluida la causa, el desarrollo, el progreso, la persistencia o la patología de la enfermedad o afección.

45 El término "epítopo" como se usa en el presente documento significa una porción de un antígeno al que se une específicamente un anticuerpo. Los epítomos generalmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas (como polares, no polares o hidrófobos) de restos tales como aminoácidos o cadenas laterales de polisacáridos y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un epítopo puede estar compuesto por uno o ambos aminoácidos contiguos o no contiguos que
50 forman una unidad espacial conformacional. Para un epítopo no contiguo, los aminoácidos de diferentes porciones de la secuencia lineal del antígeno se encuentran en proximidad cercana en el espacio tridimensional a través del plegamiento de la molécula de proteína.

55 El término "paratopo" como se usa en el presente documento significa una porción de un anticuerpo al que se une específicamente un antígeno. Un paratopo puede ser de naturaleza lineal o discontinua, formada por una relación espacial entre aminoácidos no contiguos de un anticuerpo en lugar de una serie lineal de aminoácidos. Un "paratopo de cadena ligera" y un "paratopo de cadena pesada" o "residuos de aminoácido de paratopo de cadena ligera" y "residuos de aminoácido de paratopo de cadena pesada" se refieren a residuos de cadena ligera y cadena pesada de anticuerpo en contacto con un antígeno, respectivamente.

60 La expresión "unión específica", como se usa en el presente documento, se refiere a la unión de anticuerpos a un antígeno predeterminado con mayor afinidad que a otros antígenos o proteínas. Típicamente, el anticuerpo se une con una constante de disociación (K_D) de 10^{-7} M o menos, y se une al antígeno predeterminado con un K_D es decir, al menos diez veces menos que su K_D para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína o cualquier otro polipéptido específico) distinto del antígeno predeterminado. Las frases "un anticuerpo que reconoce
65 un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en el presente documento con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno" o "un anticuerpo específico de antígeno", por

ejemplo, un anticuerpo específico de IL-17A. La constante de disociación se puede medir utilizando procedimientos estándar.

5 La expresión "actividad biológica de IL-17A" o "activación de IL-17A" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier actividad que se produce como resultado de la unión de IL-17A al receptor de IL-17A. Las actividades biológicas de ejemplo de IL-17A dan como resultado un aumento de la secreción de IL-6 o IL-8, la activación de NF-κB o la regulación de las quinasas derivadas como ERK1, ERK2 y p38 tras la unión al receptor de IL-17A. La liberación de citocinas y quimiocinas de las células, tejidos o en circulación, la activación de NF-κB o los eventos de fosforilación de la quinasa se puede medir utilizando procedimientos bien conocidos, por ejemplo, inmuoensayos, inmunotransferencia o sistemas de genes informadores (Yao et al., *Immunity* 3: 811-21, 1995; Awane et al., *J. Immunol.* 162: 5337-44, 1999).

15 El término "vector" significa un polinucleótido capaz de duplicarse dentro de un sistema biológico o que puede moverse entre dichos sistemas. Los polinucleótidos vectoriales típicamente contienen elementos, como orígenes de replicación, señales de poliadenilación o marcadores de selección, que funcionan para facilitar la duplicación o el mantenimiento de estos polinucleótidos en un sistema biológico. Los ejemplos de tales sistemas biológicos pueden incluir una célula, virus, animal, planta y sistemas biológicos reconstituidos que utilizan componentes biológicos capaces de duplicar un vector. El polinucleótido que comprende un vector puede ser moléculas de ADN o ARN o un híbrido de estos.

20 La expresión "vector de expresión" significa un vector que puede utilizarse en un sistema biológico o en un sistema biológico reconstituido para dirigir la traducción de un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótido presente en el vector de expresión.

25 El término "polinucleótido" significa una molécula que comprende una cadena de nucleótidos unidos covalentemente por un esqueleto de azúcar-fosfato u otra química covalente equivalente. Los ADN y los ARN bicatenarios y monocatenarios son ejemplos típicos de polinucleótidos.

30 El término "polipéptido" o "proteína" significa una molécula que comprende al menos dos residuos de aminoácidos unidos por un enlace peptídico para formar un polipéptido. Los polipéptidos pequeños de menos de 50 aminoácidos pueden denominarse "péptidos".

35 Los códigos de aminoácidos convencionales de una y tres letras se usan en el presente documento de la siguiente manera:

Aminoácidos	Código de tres letras	Código de una letra
Alanina	ala	A
Arginina	arg	R
Asparagina	asn	N
Aspartato	áspid	D
Cisteína	cys	C
Glutamato	glu	E
Glutamina	gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	su	H
Isoleucina	ile	I
Leucina	leu	L
Lisina	lys	K
Metionina	reunió	M
Fenilalanina	phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	ser	S
Treonina	thr	T
Triptófano	trp	W

Aminoácidos	Código de tres letras	Código de una letra
Tirosina	Tyr	Y
Valina	val	V

Composiciones de la materia

5 La presente divulgación proporciona antagonistas de anticuerpos de IL-17A capaces de inhibir la actividad biológica de IL-17A y usos de tales anticuerpos. Los mecanismos de ejemplo mediante los cuales la activación de IL-17A puede ser inhibida por tales anticuerpos incluyen inhibición *in vitro*, *in vivo* o *in situ* de la homodimerización o heterodimerización de IL-17A, y bloqueo de la unión de IL-17A al receptor de IL-17A, inhibición de la dimerización del receptor, inhibición de la actividad de la quinasa de las vías de señalización aguas abajo, o inhibición de la transcripción del ARNm de IL-17A. Otros antagonistas de anticuerpos capaces de inhibir la activación de IL-17A por otros mecanismos también están dentro del alcance de los diversos aspectos y realizaciones de la invención. Estos antagonistas son útiles como reactivos de investigación, reactivos de diagnóstico y agentes terapéuticos.

15 La divulgación proporciona nuevos sitios de unión a antígeno derivados de bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. La estructura para llevar un sitio de unión a antígeno es generalmente una cadena pesada o ligera de anticuerpo o una porción de la misma.

20 La divulgación proporciona un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une específicamente a la IL-17A humana, que comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), en el que el anticuerpo comprende la región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR) 1, 2 y 3 (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) secuencias de aminoácidos y las secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad (CDR) de cadena ligera 1, 2 y 3 (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) como se muestra en la Tabla 1a.

25

Tabla 1a.

Familia	N. ° MORMAB	N.° mAb	SEQ ID NO:					
			LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
2	7702		1	4	7	23	26	52
	7701		1	4	7	23	27	52
	7708	624	1	4	7	23	28	52
	8297		1	4	7	23	29	52
	8298		1	4	7	23	30	52
	7785	3077	1	4	7	23	31	52
	8104	7024	1	4	7	23	32	52
	8105		1	4	7	23	33	52
	7786		1	4	7	23	34	52
	Secuencia de consenso			1	4	7	23	35
6a	Clon 10		2	5	8	24	36	53
	Clon 11		2	5	9	24	36	53
	Clon 12		2	5	10	24	36	53
	Secuencia de consenso			2	5	11	24	36
6b	Clon 13		2	5	12	24	36	53
	7706	4538	2	5	13	24	36	53
	8299	3584	2	5	13	24	36	54
	8300		2	5	13	24	36	55
	8301		2	5	13	24	36	56
	Clon 15		2	5	14	24	36	53

ES 2 728 115 T3

Familia	N.º MORMAB	N.º mAb	SEQ ID NO:					
			LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
	Clon 16		2	5	15	24	36	53
	7775	732	2	5	16	24	36	53
	8101		2	5	16	24	36	54
	8102		2	5	16	24	36	55
	8103	4168	2	5	16	24	36	56
	Secuencia de consenso		2	5	17	24	36	57

Familia	N.º MORMAB	N.º mAb	SEQ ID NO:					
			LCDR1	LCDR2	LCDR3	HCDR1	HCDR2	HCDR3
	Clon 179		3	6	18	25	37	58
	Clon 180		3	6	18	25	38	58
	7709		3	6	18	25	39	58
	Clon 182		3	6	18	25	40	58
	7700	1926	3	6	18	25	41	58
	8095		3	6	18	25	42	58
	8096		3	6	18	25	43	58
	8097		3	6	18	25	41	59
	8098		3	6	18	25	41	60
	8141		3	6	19	25	41	58
19a	8142		3	6	20	25	41	58
	8143		3	6	21	25	41	58
	8160	7146	3	6	19	25	41	60
	8161		3	6	20	25	41	60
	8162		3	6	21	25	41	60
	8302	6785	3	6	18	25	43	60
	8303		3	6	20	25	43	60
		5548	3	6	19	25	43	60
	7768		3	6	18	25	44	58
	Clon 185		3	6	18	25	45	58
	Secuencia de consenso		3	6	22	25	46	61
19b	Clon 186		3	6	18	25	47	58
	Clon 187		3	6	18	25	48	58
	Clon 188		3	6	18	25	49	58
	Clon 189		3	6	18	25	50	58
	Secuencia de consenso		3	6	18	25	51	58

- 5 En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a IL-17A humana, que comprende un VH y un VL, en donde el anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos HCDR1, HCDR2 y HCDR3 como se muestra en las SEQ ID NO: 23, 35 y 52, en las que HCDR2 de la SEQ ID NO: 35 se define adicionalmente como se muestra en la Fórmula (I):

Xaa₁-I-I-P-W-F-G-Xaa₂-T-Xaa₃-Y-A-Q-K-F-Q-G,(I)

en la que

5 Xaa₁ puede ser His, Met, Arg, Ser o Tyr;

Xaa₂ puede ser Trp, Thr o Tyr; y

Xaa₃ puede ser Tyr, Phe, Ser o Asp.

10 En otras realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a IL-17A humana, que comprende un VH y un VL, en donde el anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos LCDR1, LCDR2 y LCDR3 como se muestra en las SEQ ID NO: 2, 5 y 11, en las que la LCDR3 de la SEQ ID NO: 11 se define adicionalmente como se muestra en la Fórmula (II):

15 Xaa₄-Q-Xaa₅-Xaa₆-Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Xaa₁₀,(II)

en la que

20 Xaa₄ puede ser His o Gln;

Xaa₅ puede ser Phe o Gly;

Xaa₆ puede ser Thr, Val o Asn;

25 Xaa₇ puede ser Ile, Thr o Tyr;

Xaa₈ puede ser Pro o Arg;

30 Xaa₉ puede ser Ser o Pro; y

Xaa₁₀ puede ser His, Phe o Leu.

35 En otras realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a la unión de IL-17A humana, que comprende un VH y un VL, en donde el anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos LCDR1, LCDR2 y LCDR3 como se muestra en las SEQ ID NO: 2, 5 y 17, en donde el LCDR3 de la SEQ ID NO: 17 se define adicionalmente como se muestra en la Fórmula (III):

40 Xaa₁₁-Q-Xaa₁₂-Xaa₁₃-Xaa₁₄-Xaa₁₅-Xaa₁₆-Xaa₁₇-Xaa₁₈-T, (III)

en la que

Xaa₁₁ puede ser Gln o Thr;

45 Xaa₁₂ puede ser Ser o Tyr;

Xaa₁₃ puede ser Asn, Arg, Val o Tyr;

Xaa₁₄ puede ser His o Ser;

50 Xaa₁₅ puede ser Ile, Thr, Leu, Ala o Ser;

Xaa₁₆ puede ser Pro, Leu o Ser;

55 Xaa₁₇ puede ser Pro, Ser, Phe o Leu; y

Xaa₁₈ puede ser Ala, Leu o Asp.

60 En otras realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a IL-17A humana, que comprende un VH y un VL, en donde el anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos HCDR1, HCDR2 y HCDR3 como se muestra en las SEQ ID NO: 24, 36 y 57, en las que HCDR3 de la SEQ ID NO: 57 se define adicionalmente como se muestra en la Fórmula (IV):

65 E-V-D-S-Xaa₁₉-Y-Y-S-Y-F-D-I,(IV)

en la que

Xaa₁₉ Es Met, Ile, Leu o Thr.

5 En otras realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a IL-17A humana, que comprende un VH y un VL, en donde el anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos LCDR1, LCDR2 y LCDR3 como se muestra en las SEQ ID NO: 3, 6 y 22, en las que LCDR3 de la SEQ ID NO: 22 se define adicionalmente como se muestra en la Fórmula (V):

G-S-Y-D-F-F-L-G-Xaa₂₀-I-V, (V)

10 en la que

Xaa₂₀ es Met, Leu, Thr o Tyr.

15 En otras realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a IL-17A humana, que comprende un VH y un VL, en donde el anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos HCDR1, HCDR2 y HCDR3 como se muestra en las SEQ ID NO: 25, 46 y 61, en las que HCDR2 de la SEQ ID NO: 46 se define adicionalmente como se muestra en la Fórmula (VI):

Xaa₂₁-I-Xaa₂₂-Xaa₂₃-Xaa₂₄-Xaa₂₅-Xaa₂₆-Xaa₂₇-Xaa₂₈-Xaa₂₉-Y-A-D-S-V-K-G, (VI)

20 en la que

Xaa₂₁ puede ser Ala, Gly, Thr o Val;

25 Xaa₂₂ puede ser Asn o Ser;

Xaa₂₃ puede ser Gly, Met, Lys, Ile, Leu o His;

30 Xaa₂₄ puede ser Leu, Asp, Ala, His, Thr, Gly o Ser;

Xaa₂₅ puede ser Gly o Ser;

Xaa₂₆ puede ser Thr, Gly, Tyr o Asp;

35 Xaa₂₇ puede ser His, Trp, Tyr o Phe;

Xaa₂₈ puede ser Lys, Thr o Ile; y

40 Xaa₂₉ puede ser Tyr, Phe o Asn, y

HCDR3 de la SEQ ID NO: 61 se define como se muestra en la Fórmula (VII):

Q-L-Xaa₃₀-L-D-V, (VII)

45 donde

Xaa₃₀ Puede ser Met, Leu o Thr.

50 En otras realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a IL-17A humana, que comprende un VH y un VL, en donde el anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos HCDR1, HCDR2 y HCDR3 como se muestra en las SEQ ID NO: 25, 51 y 58, en las que HCDR2 de la SEQ ID NO: 51 se define adicionalmente como se muestra en la Fórmula (VIII):

V-T-S-Xaa₃₁-Xaa₃₂-Xaa₃₃-Xaa₃₄-T-Y-Y-A-Xaa₃₅-S-V-K-G, (VIII)

55 en la que

Xaa₃₁ puede ser Ala, Lys, Met o His;

60 Xaa₃₂ puede ser Asn, Met, Thr o Arg;

Xaa₃₃ puede ser Gly o Asp;

Xaa₃₄ puede ser Arg, His o Asn; y

65 Xaa₃₅ Puede ser Asp o Gly.

Los anticuerpos cuyas secuencias de aminoácidos del sitio de unión al antígeno son sustancialmente idénticas a las que se muestran en la Tabla 1a (SEQ ID NO: 1-61) se incluyen dentro del alcance de la divulgación. Típicamente, esto implica una o más sustituciones de aminoácidos con un aminoácido que tiene una carga similar o características estereoquímicas o hidrófobas, y se hacen para mejorar las propiedades de los anticuerpos, por ejemplo, la estabilidad o la afinidad. por ejemplo, una sustitución conservadora puede implicar una sustitución de un residuo de aminoácido nativo con un residuo no nativo de tal manera que haya poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga del residuo de aminoácido en esa posición. Además, cualquier residuo nativo en el polipéptido también puede estar sustituido con alanina, como se ha descrito previamente para la mutagénesis de barrido de alanina (MacLennan et al., Acta Physiol. Scand. Supl. 643: 55-67, 1998; Sasaki et al., Adv. Biofis 35: 1-24, 1998). Las sustituciones conservadoras producirán moléculas con características funcionales y químicas similares a las de la molécula a partir de la cual se realizan dichas modificaciones. Las sustituciones no conservadoras en las características funcionales y/o químicas de las moléculas pueden lograrse seleccionando sustituciones en la secuencia de aminoácidos que difieren significativamente en su efecto en mantener (1) la estructura del esqueleto molecular en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en hoja o helicoidal, (2) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (3) el tamaño de la molécula. Las sustituciones de aminoácidos deseadas (ya sean conservadoras o no conservadoras) pueden ser determinadas por los expertos en la técnica en el momento en que se deseen tales sustituciones. por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos pueden usarse para identificar residuos importantes para la función de los anticuerpos, como los residuos que afectan la afinidad, o los residuos que imparten propiedades indeseables, como la agregación. Las sustituciones de aminoácidos de ejemplo se muestran en la Tabla 1b y la Figura 1.

Las sustituciones en las regiones marco, en contraste con los sitios de unión al antígeno, también pueden hacerse siempre que no afecten adversamente las propiedades del anticuerpo. Se pueden hacer sustituciones del marco, por ejemplo, en los residuos de la Zona Vernier (Patente de EE.UU. N.º 6,649,055) para mejorar la afinidad o estabilidad del anticuerpo. También se pueden realizar sustituciones en las posiciones marco en el anticuerpo que difieren en secuencia cuando se comparan con las secuencias de genes de la línea germinal humana homólogas para reducir la posible inmunogenicidad. Estas modificaciones se pueden hacer, por ejemplo, a anticuerpos derivados de *de novo* bibliotecas de anticuerpos, tales como bibliotecas pIX.

30

Tabla 1b.

Residuo original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones más conservadoras.
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Áspid	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Gly	Pro, ala	Ala
Su	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, ácido 1,4Diamino-butírico, Gln, Asn	Arg
Reunió	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser, Ala	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucine	Leu

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos también abarcan residuos de aminoácidos no naturales que se incorporan típicamente por síntesis química de péptidos en lugar de por síntesis en sistemas biológicos. Las

sustituciones de aminoácidos se pueden hacer, por ejemplo, mediante mutagénesis por PCR (Patente de EE.UU. N.º 4,683,195). Se pueden generar bibliotecas de variantes usando procedimientos bien conocidos, por ejemplo, usando codones aleatorios (NNK) o no aleatorios, por ejemplo codones DVK, que codifican 11 aminoácidos (ACDEGKNRSYW), y seleccionando las bibliotecas o variantes con las propiedades deseadas, como se muestra en el Ejemplo 1. La Figura 1 muestra las sustituciones realizadas a cinco antagonistas de anticuerpos IL-17A parentales dentro de las regiones LCDR3, HCDR2 y HCDR3 para mejorar las propiedades del anticuerpo. Las propiedades mejoradas, como la afinidad o la estabilidad, se pueden medir mediante procedimientos bien conocidos.

5 En otras realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a la IL-17A humana, que comprende una VH y una VL, en la que el anticuerpo comprende ciertas secuencias VH y VL, y también proporciona cada VH y VL aislada como se muestra en Tabla 2.

Tabla 2.

N.º MOR	SEQ ID NO:		N.º mAb	SEQ ID NO:			
	VL	VH		VL	VH	Cadena de luz	Cadena pesada
Familia 2							
7708	62	67	624	76	67	87	92
7785	62	68	3077	76	68	87	93
8104	62	69	7024	76	69	87	94
Familia 6b							
7706	63	70	4538	77	81	88	95
8299	63	71	3584	77	82	88	96
7775	64	70	732	78	81	89	95
8103	64	72	4168	78	83	89	97
Familia 19a							
7700	65	73	1926	79	84	90	98
8160	66	74	7146	80	85	91	99
8302	65	75	6785	79	86	90	100
			5548	80	86	91	100

15 Aunque las realizaciones ilustradas en los Ejemplos comprenden pares de regiones variables, pares de cadenas de anticuerpos de longitud completa, o pares de regiones CDR1, CDR2 y CDR3, uno de una cadena pesada y uno de una cadena ligera, un experto en la técnica reconocerá que realizaciones alternativas pueden comprender regiones variables de cadena pesada única o regiones variables de cadena ligera única, cadenas de anticuerpo de longitud completa única, o regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de una cadena de anticuerpo, sea pesada o ligera. La región variable única, la cadena de anticuerpo de longitud completa o la región CDR1, CDR2 y CDR3 de una cadena se pueden usar para seleccionar los dominios correspondientes en otra cadena, las dos cadenas capaces de formar un anticuerpo que se une específicamente a IL-17A. La selección puede llevarse a cabo mediante procedimientos de selección de visualización de fagos usando, por ejemplo, un enfoque combinatorio dual jerárquico descrito en la publicación PCT. N.º WO92/01047. En este enfoque, una colonia individual que contiene un clon de la cadena H o L se usa para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H), y el dominio de unión al antígeno específico de dos cadenas resultante se selecciona de acuerdo con técnicas de presentación en fagos como se describe.

30 En otras realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a la IL-17A humana, que comprende un VH y un VL que tienen secuencias de aminoácidos al menos el 90 % idénticas a las secuencias de aminoácidos VH y VL que se muestran en la Tabla 2.

35 En otras realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a la IL-17A humana, que comprende un VH y un VL que tienen secuencias de aminoácidos al menos el 95 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de VH y VL que se muestran en la Tabla 2.

40 En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo o fragmento aislado que tiene ciertas secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada como se muestra en la Tabla 2. Además de numerar los residuos de anticuerpos secuencialmente, los polipéptidos que codifican cadenas de anticuerpos pueden numerarse según la numeración de Kabat o Chothia (Kabat et al., sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health

Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991; Chothia and Lesk, Mol. Biol. 196:901-917, 1987). En la Figura 3 se muestran ejemplos de correspondencia entre la numeración secuencial, Kabat y Chotia para cadenas de anticuerpos seleccionadas. Las posiciones resaltadas en gris indican regiones CDR de anticuerpos.

5 En otras realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a IL-17A humana, que comprende un VH y un VL, en donde el anticuerpo comprende un paratopo de la región variable de la cadena pesada seleccionado de los residuos de Chothia S51, T53, F56, Y58, Q95, L96 y T97 y un paratopo de región variable de cadena ligera seleccionado de los residuos de Chothia Y32, D50, Y91, F93 y F94. El paratopo de la cadena pesada y el paratopo de la cadena ligera los residuos de Chothia corresponden a los residuos de la cadena pesada S52, T54, F57, Y59, Q99, L100 y T101 de la SEQ ID NO: 86 y los residuos de la cadena ligera Y31, D49, Y90, F92 y F93 de la SEQ ID NO: 79.

15 En otras realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a la IL-17A humana, que comprende los residuos de aminoácidos del paratopo de la región variable de la cadena pesada que interactúan con los residuos de la IL-17A humana que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 105, que comprende:

un primer residuo de treonina que interactúa con R55 o E57 de IL-17A humana;

20 un residuo de glutamina que interactúa con R55 o E57 de IL-17A humana;

un residuo de lisina que interactúa con E57 de IL-17A humana;

25 un residuo de tirosina que interactúa con P59, E60 o R101 de IL-17A humana;

un residuo de fenilalanina que interactúa con E60, R101, E102 o P103 de IL-17A humana;

un residuo de serina que interactúa con E60 de IL-17A humana; y

30 un segundo residuo de treonina que interactúa con E60 de IL-17A humana.

En otras realizaciones, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a la IL-17A humana, que comprende los residuos de aminoácidos del paratopo de la región variable de la cadena ligera que interactúan con los residuos de la IL-17A humana que tienen la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 105, que comprende:

un primer residuo de fenilalanina que interactúa con L26 de IL-17A humana;

40 un residuo de ácido aspártico que interactúa con R55 o W67 de IL-17A humana;

un primer residuo de tirosina que interactúa con P59, S64 o R101 de IL-17A humana;

un segundo residuo de fenilalanina que interactúa con P59, E60, R61, Y62, R101 o F110 de IL-17A humana; y

45 un segundo residuo de tirosina que interactúa con V65 de IL-17A humana.

En otra realización, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a IL-17A humana, que comprende residuos de aminoácidos de paratopo de región variable de cadena pesada y residuos de aminoácidos de paratopo de región variable de cadena ligera que interactúan con residuos de IL-17A humana que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 105, que comprende:

un residuo de tirosina en la región variable de la cadena pesada que interactúa con R101 de IL-17A humana;

55 un residuo de fenilalanina en la región variable de la cadena pesada que interactúa con R101, de IL-17A humana;

un primer residuo de fenilalanina en la región variable de la cadena ligera que interactúa con Y62 y R101 de IL-17A humana;

60 un segundo residuo de fenilalanina en la región variable de la cadena ligera que interactúa con L26 y F110 de IL-17A humana; y

un residuo de tirosina en la región variable de la cadena ligera que interactúa con R101 de IL-17A humana.

65 En otra realización, la divulgación proporciona un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a IL-17A humana, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en la que el anticuerpo comprende:

un paratopo de región variable de cadena pesada seleccionado de los restos F56 e Y58 de Chothia; y

un paratopo de región variable de cadena ligera seleccionado de los residuos de Chothia Y91, F93 y F94.

5 Los residuos de Chothia del paratopo de cadena pesada F56 y Y58 y los residuos de Chothia del paratopo de cadena ligera Y91, F92 y F94 son residuos en contacto directo con los residuos de IL-17A L26, Y62, R101 y F110. Estos residuos de IL-17A son parte del epítipo Fab6468 y de la cavidad de bolsillo P2 (véase más adelante). Si bien no desea unirse a ninguna teoría particular, se cree que la interacción entre el Fab6468 y la IL-17A en estos residuos seleccionados puede ser suficiente para que el anticuerpo bloquee la actividad de la IL-17A.

10 Los mAb completamente humanos que carecen de secuencias no humanas pueden prepararse y optimizarse a partir de bibliotecas de presentación de fagos mediante técnicas a las que se hace referencia en, por ejemplo, Knappik y col., *J. Mol. Biol.* 296: 57-86, 2000; y K_D bs y col., *J. Immunol. Meth* 254: 67-84 2001. En un procedimiento de ejemplo, los anticuerpos de la invención se aíslan de bibliotecas que expresan regiones variables de cadena ligera y pesada de anticuerpo como proteínas de fusión con proteína de revestimiento pIX de bacteriófago. Las bibliotecas de anticuerpos se seleccionan para determinar su unión a IL-17mut6 humana (SEQ ID NO: 105), y los clones positivos obtenidos se caracterizan adicionalmente, los Fab se aíslan de los lisados del clon y se expresan como IgG de longitud completa. Bibliotecas de anticuerpos y procedimientos de selección de ejemplo se describen en Shi et al., *J. Mol. Biol.* 397: 385-96, 2010; N.º de solicitud de patente PCT N.º WO09/085462 y N.º de serie de EE.UU. 12/546850; U.S. Pat. Nos. 5,223,409, 5,969,108 y 5,885,793).

Los mAb resultantes pueden modificarse aún más en sus regiones marco para cambiar ciertos residuos de marco a los presentes en una línea germinal humana correspondiente, como se ilustra en el presente.

25 Los anticuerpos de la invención que se unen a los epítipos específicos de IL-17A se pueden preparar inmunizando ratones humanizados que expresan loci de inmunoglobulina humana (Lonberg et al., *Nature* 368: 856-9, 1994; Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14: 845-51, 1996; Mendez et al., *Nature Genetics* 15: 146-56, 1997, Patentes de EE.UU. N.º 5.770.429, 7.041.870 y 5.939.598) o ratones Balb/c con los péptidos que codifican los epítipos, por ejemplo péptido ₅₆NEDPERYPSVIWE₆₈ (SEQ ID NO: 157) o ₁₀₀RREPPHCPNSFRLEKIL₁₁₆ (SEQ ID NO: 158) y usando el procedimiento hybrodima de Kohler et al., *Nature* 256: 495-97. Los anticuerpos resultantes se analizan para determinar su unión al epítipo utilizando procedimientos estándar. Los mAb identificados pueden modificarse adicionalmente incorporando residuos de soporte de estructura alterados para preservar la afinidad de unión mediante técnicas como las que se describen en Queen et al., *Proc. Natl Acad Sci. (EE. UU.)*, 86: 10029-32, 1989 y Hodgson et al., *Bio/Technology*, 9: 421, 1991.

35 Los anticuerpos aislados que tienen ciertos residuos paratópicos (p. Ej., Los residuos paratópicos centrales definidos en la Tabla 10) que se unen específicamente a la IL-17A humana pueden prepararse, por ejemplo, injertando los residuos paratópicos en un armazón adecuado, ensamblando los armazones diseñados en anticuerpos completos, que expresan los anticuerpos resultantes, y que prueban la unión de los anticuerpos a IL-17A o un efecto sobre la actividad biológica de IL-17A. Los armazones de ejemplo son secuencias de aminoácidos de regiones variables de anticuerpos humanos codificadas por genes de la línea germinal humana. Los armazones pueden seleccionarse basándose, por ejemplo, en la homología de secuencia global, el % de identidad entre los residuos del paratopo o la identidad de la clase de estructura canónica entre el armazón y un anticuerpo de ejemplo, como el mAb6785. Los genes de la línea germinal de anticuerpos humanos se describen, por ejemplo, en Tomlinson et al., *J. Mol. Biol* 227: 776-798., y en la base de datos de International ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>). Las regiones del marco humano de consenso también se pueden utilizar, por ejemplo, como se describe en Patente de EE.UU. N.º 6.054.297. La selección del armazón adecuado se puede hacer, por ejemplo, de acuerdo con los procedimientos descritos en La publicación PCT N.º WO10/045340.

50 Los genes de la línea germinal humana de ejemplo que se pueden usar como andamiajes en los que se injertan los residuos del paratopo son los genes codificados por los marcos V λ 3, Vh3, J λ y Jh. Los genes V κ 3 de ejemplo son IGLV3-1, IGLV3-9, IGLV3-10, IGLV3-12, IGLV3-16, IGLV3-19, IGLV3-21, IGLV3-22, IGLV3-25, IGLV3-27 e IGLV3-32 (IMGT nomenclatura, * 01 alelos), (SEQ ID NOs: 117-127, respectivamente). Los genes J λ de ejemplo son IGLJ1, IGLJ2, IGLJ3, IGLJ4, IGLJ5, IGLJ6 e IGLJ7 (SEQ ID NOs: 128-134, respectivamente). Los genes Vh3 de ejemplo son IGHV3-7, IGHV3-9, IGHV3-11, IGHV3-16, IGHV3-19, IGHV3-20, IGHV3-21, IGHV3-23, IGHV3-30, IGHV3-30 * 03, IGHV3-33, IGHV3-45, IGHV3-48, IGHV3-64, e IGHV3-74 (nomenclatura IMGT, alelos * 01, excepto cuando se especifica un alelo diferente) (SEQ ID NO: s 135-150, respectivamente). Los genes de ejemplo de Jh son IGHJ1, IGHJ2, IGHJ3, IGHJ4, IGHJ5 e IGHJ6 (SEQ ID NO: s 151-156, respectivamente). Las regiones J de la línea germinal se utilizan en su totalidad o en parte para seleccionar secuencias FR4. por ejemplo, los residuos del paratopo de la cadena ligera mAb6785 pueden injertarse en un marco de la proteína V λ 3 codificado por IGLV3-1 (SEQ ID NO: 117) que se une a la secuencia de la región J codificada por IGLJ2 (SEQ ID NO: 129) con inserción de un único residuo de aminoácido entre las secuencias IGLV3-1 e IGLJ2, por ejemplo, metionina. La estructura de la proteína V λ 3 codificada por IGLV3-1 puede contener sustituciones adicionales, por ejemplo, una sustitución del residuo de cisteína en la posición 33 de la SEQ ID NO: 117 ("AdoW ") con, por ejemplo, asparagina; y sustitución de los residuos 1-3 de la SEQ ID NO: 117 (" SYE ") con una secuencia amino-terminal común a otras familias de cadenas lambda, como " QSV "de la familia IGLV1. Secuencias de otros genes V λ 3 y J λ funcionales de ejemplo

pueden usarse para injertar residuos de paratopo de cadena ligera mAb6785 con la inserción de cero, uno, o dos residuos de aminoácidos entre el extremo carboxi codificado por los genes V λ 3 y el término amino codificado por los genes J λ , la longitud de la región CDR3 es de 11 aminoácidos. por ejemplo, la metionina y la isoleucina pueden insertarse entre IGLV3-22 (SEQ ID NO: 124) e IGLJ2 (SEQ ID NO: 129). La Figura 2A muestra la alineación de una luz de ejemplo. armazones de cadena que se pueden usar para injertar. Los residuos del paratopo de cadena pesada mAb6785 se pueden injertar, por ejemplo, en un marco Vh3 codificado por IGHV3-23 (SEQ ID NO: 142), que se une a la secuencia de la región J FR4 (11 C aminoácidos terminales, por ejemplo, "WGQGTLTVSS") de IGHJ1 (SEQ ID NO: 151), con la inserción de aproximadamente 5-7 residuos, por ejemplo 6 residuos, que constituyen HCDR3, entre las regiones V y J. El HCDR3 insertado alrededor de 5-7 residuos incluye la inserción de glutamina, leucina y treonina, por ejemplo, 3 de los residuos de paratopo de mAb6785 Vh (Tabla 10). Se pueden usar secuencias de otros genes Vh3 y Jh funcionales de ejemplo para injertar residuos de paratopo de cadena pesada mAb6785. En algunos casos, un aminoácido C-terminal del gen Vh3 puede eliminarse antes de la inserción de los aproximadamente 5-7 residuos que constituyen el HCDR3, de modo que solo se incluyan secuencias FR3 en el armazón. También se pueden usar secuencias de otros genes Vh3 que codifican una CDR2 de 17 residuos (residuos 50-66 de IGHV3-23 (SEQ ID NO: 142), y las secuencias FR4 de otros genes Jh pueden sustituirse en lugar de IGJH1.

La unión específica a IL-17A humana y la actividad biológica del anticuerpo resultante se pueden evaluar usando procedimientos estándar. Las alineaciones de las regiones variables de la cadena ligera mAb6785 y las regiones variables de la cadena pesada con los ejemplos de genes Vh3, V λ 3, J λ o Jh se muestran en las Figuras 2A y 2B. Alternativamente, los residuos de paratopo extendidos de mAb6785, como se define en la Tabla 10, se pueden usar en lugar de los residuos de paratopo de núcleo. Los anticuerpos de ingeniería injertados en paratopos pueden modificarse aún más mediante sustituciones de los residuos de la Zona Vernier (Patente de EE.UU. N.º 6,639,055) o la afinidad que determina los residuos (U.S. Pat. Appl. No. 2010/0261620; Cobaugh y col., J Mol Biol. 378: 622-33, 2008) para mejorar las propiedades de los anticuerpos, por ejemplo, la afinidad. Siempre que el anticuerpo injertado en paratopo retenga la unión a IL-17A, la secuencia de aminoácidos marco en el anticuerpo injertado en paratopo puede ser del 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a las secuencias marco mAb6785. Se pueden usar variantes alélicas de las estructuras de genes de línea germinal de ejemplo en lugar de las secuencias de proteínas de las regiones V y J. Las secuencias de las variantes alélicas son bien conocidas y se pueden obtener en la base de datos de International ImMunoGeneTics (IMGT) (<http://www.imgt.org>).

Las secuencias de los sitios de unión al antígeno pueden injertarse además de los residuos paratópicos usando procedimientos estándar. por ejemplo, un HCDR3 o LCDR3 completo puede ser injertado.

Otra realización de la divulgación es un anticuerpo o fragmento aislado que se une específicamente a IL-17A humana que compite por la unión de IL-17A humana con un anticuerpo monoclonal que comprende ciertas secuencias de aminoácidos HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y LCDR1, LCDR2 y LCDR3. Los anticuerpos monoclonales de la invención son un anticuerpo aislado que comprende secuencias de aminoácidos HCDR1, HCDR2 y HCDR3 como se muestra en las SEQ ID NO: 25, 43 y 60 y las secuencias de aminoácidos LCDR1, LCDR2 y LCDR3 como se muestra en las SEQ ID NO: 3, 6, y 18.

La competición entre la unión específica a IL-17A puede ser analizada *in vitro* utilizando procedimientos bien conocidos. por ejemplo, la unión del anticuerpo MSS sulfo-Tag™ NHS-éster a IL-17A en presencia de un anticuerpo no etiquetado se puede evaluar mediante ELISA.

Otra realización de la divulgación es un anticuerpo aislado o anticuerpo o fragmento del mismo, en el que el anticuerpo se une específicamente a IL-17A humana que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 105 en los residuos de aminoácidos 56-68 (SEQ ID NO: 157) y 100-116 (SEQ ID NO: 158); o en los residuos L26, R55, E57, P59, E60, R61, Y62, S64, V65, W67, R101, E102, P103 y F110.

Se pueden emplear varias metodologías bien conocidas para determinar el epítipo de unión de los anticuerpos de la invención. por ejemplo, cuando las estructuras de ambos componentes individuales son conocidas, acoplamiento de proteína-proteínas *in silico* se puede llevar a cabo para identificar sitios de interacción compatibles. El intercambio de hidrógeno-deuterio (H/D) se puede llevar a cabo con el complejo de antígeno y anticuerpo para mapear regiones en el antígeno que puede estar unido por el anticuerpo. La mutagénesis segmentaria y puntual del antígeno se puede usar para localizar los aminoácidos importantes para la unión del anticuerpo. La estructura de co-cristal del complejo antígeno-anticuerpo se utiliza para identificar los residuos que contribuyen al epítipo y al paratopo.

Los anticuerpos anti-IL-17A descritos previamente se unen a epítipos en IL-17A distintos del epítipo para Fab6468 descrito en la presente descripción. Los anticuerpos que se unen a los residuos de IL-17A humana (SEQ ID NO: 105) 74-85, 46-53, 71-87, 80-86, 11-18, 29-41 o 54-62 se han descrito (Publicaciones PCT N.º WO08/021156, WO07/106769, WO07/149032, WO07/070750; Solicitud de EE.UU. N.º US2008/095775, respectivamente). Los epítipos conformacionales se han descrito en la publicación PCT N.º WO09/130459 y Gerhardt y col., J. Mol. Biol. 394: 901-21, 2009.

Otra realización de la divulgación es un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, en el que el anticuerpo se une específicamente a una cavidad de bolsillo P2 en IL-17A, comprendiendo la cavidad de bolsillo P2 de los residuos de aminoácidos V22, V24, L26, 128, Y62, L99, R101, F110 y L112 de la SEQ ID NO: 105.

5 La estructura de co-cristal del homodímero de IL-17A con el anti-IL-17A Fab6468 identificó una cavidad de bolsillo P2 hidrófoba en la superficie del homodímero de IL-17A, que probablemente esté involucrada en la unión de IL-17RA (ver ejemplos). La "cavidad de bolsillo P2" como se usa en el presente documento se refiere a una cavidad estructural hidrofóbica terciaria en el homodímero IL-17A, donde los residuos expuestos a la superficie en el bolsillo P2 son V24, L26, 128, Y62, L99, R101, F110 y L112 en el monómero A y V22, V24 y L112 en el monómero B, y viceversa. Los anticuerpos selectos de la divulgación reactiva con IL-17A, por ejemplo Fab6468, tienen contactos directos con los residuos de la cavidad de bolsillo P2 L26, Y62, R101 y F110, cuyos residuos también forman parte del epítipo Fab6468. Si bien no desea limitarse a ninguna teoría particular, se supone que los anticuerpos de la divulgación que se unen a los residuos seleccionados de la cavidad de bolsillo P2 de IL-17A bloquean la interacción entre IL-17A y IL-17RA. Basado en la estructura de cocristal, el motivo de fenilalanina (FF) en los residuos 93 y 94 en una cadena ligera (SEQ ID NO: 79) de Fab6468 bloquea la interacción IL-17A/IL-17RA, y por lo tanto es un bloqueador de cavidad de bolsillo P2. Otros antagonistas del bloqueador de la cavidad de bolsillo P2 también están dentro del alcance de esta descripción, tales como nuevos péptidos o moléculas pequeñas. Estos se pueden modelar en base a la coestructura IL-17A/Fab6468, y se pueden evaluar por su capacidad para reemplazar la unión de Fab6468 a IL-17A. Por ejemplo, los inhibidores de péptidos se pueden rastrear a partir de bibliotecas de péptidos aleatorios que han incorporado el motivo FF (por ejemplo, las bibliotecas de XXXFFXX; X indica cualquier aminoácido; F = fenilalanina) y se muestran en el bacteriófago como una fusión con por ejemplo pIII, pVII o pIX proteína de la cubierta (US5,223,409; Gao et al., Proc. Natl Acad Sci. USA, 96: 6025-30, 1999, Tornetta et al., J. Immunol. Methods. 360:39-46, 2010; Shi et al., J. Mol. Biol. 397:385-96, 2010) y posteriormente probaron su inhibición de la unión de Fab6468 a IL-17A, y la inhibición de la actividad de IL-17A.

25 Las moléculas pequeñas pueden cribarse utilizando bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales, o cualquier combinación de los mismos, y los resultados positivos primarios resultantes pueden modificarse fácilmente para producir análogos estructurales de los agentes. Los procedimientos para elaborar bibliotecas de péptidos y fusiones de pIX, y seleccionar las bibliotecas resultantes son bien conocidos.

30 Otra realización de la divulgación de un procedimiento para inhibir la interacción de IL-17A humana con IL-17RA que comprende:

35 proporcionar IL-17A e IL-17RA humanos; y

poner en contacto la IL-17A humana con un antagonista que se une específicamente al IL-17A humana en al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: V22, V24, L26, 128, Y62, L99, R101, F110 y L112.

40 Otra realización de la divulgación es un procedimiento para inhibir la actividad biológica del IL-17A humana, que comprende:

proporcionar IL-17A e IL-17RA humanos; y

45 poner en contacto la IL-17A humana con un antagonista que se une específicamente al IL-17A humana en al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: V22, V24, L26, 128, Y62, L99, R101, F110 y L112.

50 La IL-17A humana y la IL-17RA pueden proporcionarse como proteínas aisladas o proteínas de fusión. El homodímero de IL-17A humana se puede purificar a partir de medios de células Th17 activadas preparadas por *in vitro* estimulación de células T CD4 vírgenes mediante dos estimulaciones anti-CD3/anti-CD28 en presencia de IL-2, IL-23 e IL-1 β . El IL-17RA puede asociarse con células o membranas celulares, puede ser nativo o sobreexpresado, o puede ser un fragmento de IL-17RA, por ejemplo el dominio extracelular del receptor. El IL-17RA puede ser un IL-17RA humano o IL-17RA de otras especies, como de ratón, rata o mono. Los antagonistas que se unen a los residuos humanos de IL-17A V22, V24, L26, 128, Y62, L10, R101, F110 y L112 pueden identificarse por la capacidad del antagonista para reemplazar la unión de Fab6468 a IL-17A, por estudios de mutagénesis o por co-estructuras de cristal. Las proteínas de fusión de IL-17A humana e IL-17RA pueden prepararse por procedimientos bien conocidos. La proteína de fusión de ejemplo es una IL-17RA soluble fusionada a un dominio Fc de inmunoglobulina.

60 Otro aspecto de la divulgación es un polinucleótido aislado que codifica cualquiera de las cadenas pesadas de anticuerpos o las cadenas ligeras de anticuerpos o fragmentos de las mismas de la divulgación o su complemento. Ciertos polinucleótidos de ejemplo se describen en el presente documento, sin embargo, otros polinucleótidos que, dada la degeneración del código genético o las preferencias de codones en un sistema de expresión dado, codifican los antagonistas de anticuerpos de la divulgación también están dentro del alcance de la divulgación. Ejemplos de polinucleótidos se muestran en las SEQ ID NO: 101, 102, 103 y 104.

Los antagonistas de anticuerpos de ejemplo pueden ser anticuerpos de los isotipos IgG, IgD, IgE, IgA o IgM. Además, dichos antagonistas de anticuerpos pueden modificarse después de la traducción mediante procesos como la glicosilación (solicitud de EE.UU. N.º US2008/095770), isomerización, desglucosilación o modificación covalente no natural como la adición de restos de polietilenglicol (PEG) (pegilación) y lipidación. Tales modificaciones pueden ocurrir *en vivo* o *in vitro* por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden conjugarse con polietilenglicol (PEGilado) para mejorar sus perfiles farmacocinéticos. La conjugación se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Se ha demostrado que la conjugación de anticuerpos terapéuticos con PEG mejora la farmacodinámica sin interferir con la función. Véase Deckert et al., *Nt. J. Cancer* 87: 382-90, 2000; Knight et al., *Platelets* 15:409-18, 2004; Leong et al., *Cytokine* 16:106-19, 2001; and Yang et al., *Protein Eng.* 16:761-70, 2003.

Las propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos de la invención pueden mejorarse a través de modificaciones de Fc mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. El "Fc" de un anticuerpo no está involucrado directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhibe varias funciones efectoras. Un anticuerpo "Fc" es un término bien conocido y se define sobre la base de la escisión de anticuerpos con papaína. El Fc de un anticuerpo está directamente involucrado en ADCC (citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos) y CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) basada en la activación del complemento, la unión a C1q y la unión al receptor Fc. Dichos sitios de unión al receptor y al complemento de Fc son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (enumeración según el índice EU de Kabat) (Brekke y col., *Eur. J. Immunol.* 24: 2542-7, 1995; patentes de EE.UU. N.º 5.624.821, 7.597.889, Canfield y Morrison, *J. Exp. Medicina.* 173: 1483-91, 1991). por ejemplo, la mutación de Leu234/Leu235 en la región bisagra de IgG1 a L234A/L235A o Phe235/Leu236 en la región bisagra de IgG4 a P235A/L236A minimiza el enlace de FcR y reduce la capacidad de la inmunoglobulina para mediar la citotoxicidad dependiente de complemento y ADCC. Una sustitución Ser a Pro en el motivo Cys-Pro-Ser-Cys (CPSC) en la región bisagra de las cadenas pesadas de IgG4 capaces de formar enlaces disulfuro de cadenas inter o intra-pesadas *en vivo* a través de la acción de las isomerasas (Aalberse y Schuurman, *Immunology* 105: 9-19, 2002), resulta en "comportamiento similar a IgG1", es decir, las moléculas Pro-sustituidas son incapaces de formar enlaces disulfuro de cadena intra-pesada. La ubicación del motivo CPSC se encuentra típicamente en el residuo 228 de una cadena pesada madura, pero puede cambiar dependiendo de las longitudes de CDR. Un ejemplo de región Fc de IgG1 que tiene los residuos Leu234/Leu235 tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 114, en la que los residuos L117 y L118 corresponden a los residuos Leu234/Leu235 en la cadena pesada madura. Un ejemplo de región Fc de IgG4 que tiene el motivo Cys-Pro-Ser-Cys (CPSC) y los residuos Leu234/Leu235 tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 115, donde el motivo CPSC está ubicado en los residuos 106-109 y Leu234/Leu235 residuos en las posiciones 122 y 123.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención modificados para mejorar la estabilidad, selectividad, reactividad cruzada, afinidad, inmunogenicidad u otras propiedades biológicas o biofísicas deseables están dentro del alcance de la divulgación. La estabilidad de un anticuerpo está influenciada por una serie de factores, que incluyen (1) el empaquetamiento del núcleo de los dominios individuales que afecta su estabilidad intrínseca, (2) las interacciones entre proteínas y proteínas que tienen impacto en el emparejamiento de HC y LC, (3) el entierro de residuos polares y cargados, (4) red de unión H para residuos polares y cargados; y (5) la carga superficial y la distribución de residuos polares entre otras fuerzas intramoleculares e intermoleculares (Worn et al., *J. Mol. Biol.* 305: 989-1010, 2001). Los restos desestabilizantes de la estructura potencial pueden identificarse en base a la estructura cristalina del anticuerpo o mediante el modelado molecular en ciertas causas, y el efecto de los residuos en la estabilidad del anticuerpo puede probarse generando y evaluando variantes que albergan mutaciones en los residuos identificados. Una de las formas de aumentar la estabilidad del anticuerpo es elevar el punto medio de transición térmica (Tm) medido por calorimetría diferencial de barrido (DSC). En general, la proteína Tm está correlacionada con su estabilidad e inversamente correlacionada con su susceptibilidad al despliegue y la desnaturalización en solución y los procesos de degradación que dependen de la tendencia de la proteína a desplegarse (Remmele et al., *Biopharm.* 13: 36-46, 2000). Varios estudios han encontrado una correlación entre la clasificación de la estabilidad física de las formulaciones medidas como estabilidad térmica por DSC y la estabilidad física medida por otros procedimientos (Gupta y col., *AAPS PharmSci.* 5E8, 2003; Zhang et al., *J. Pharm. Sci.* 93: 3076-89, 2004; Maa et al., *Int. J. Pharm.*, 140: 155-68, 1996; Bedu-Addo y col., *Pharm. Res.*, 21: 1353-61, 2004; Remmele et al., *Pharm. Res.*, 15: 200-8, 1997). Los estudios de formulación sugieren que un Fab Tm tiene implicaciones para la estabilidad física a largo plazo de un mAb correspondiente. Las diferencias en los aminoácidos en cualquier marco o dentro de las CDR podrían tener efectos significativos en la estabilidad térmica del dominio Fab (Yasui, et al., *FEBS Lett.* 353: 143-6, 1994).

Los antagonistas de anticuerpos de la invención pueden unirse a IL-17A con una K_D menor o igual a aproximadamente 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} o 10^{-12} M. La afinidad de una molécula dada por IL-17A, como un anticuerpo, se puede determinar experimentalmente usando cualquier procedimiento adecuado. Tales procedimientos pueden utilizar instrumentación Biacore o KinExA, ELISA o ensayos de unión competitiva conocidos por los expertos en la técnica.

Los antagonistas de anticuerpos que se unen a IL-17A humana con una afinidad deseada pueden seleccionarse de bibliotecas de variantes o fragmentos mediante técnicas que incluyen la maduración por afinidad de anticuerpos. Los

antagonistas de anticuerpos pueden identificarse en función de su inhibición de la actividad biológica de IL-17A utilizando cualquier procedimiento adecuado. Dichos procedimientos pueden utilizar ensayos de gen informador o ensayos que miden la producción de citocinas utilizando procedimientos bien conocidos y como se describe en la solicitud.

5 Otra realización de la invención es un vector que comprende al menos un polinucleótido de la invención. Dichos vectores pueden ser vectores de plásmidos, vectores virales, vectores para la expresión de baculovirus, vectores basados en transposones o cualquier otro vector adecuado para la introducción de los polinucleótidos de la invención en un organismo determinado o fondo genético por cualquier medio.

10 Una realización de la invención es una célula huésped que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la invención.

15 Otra realización de la divulgación es una célula huésped que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la divulgación, tal como un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 67-75 y 81-86 o una región variable de la cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 62-66 y 76-80 o una cadena pesada de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 92-100 o una cadena ligera de inmunoglobulina que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 87-91. Dichas células huésped pueden ser células eucariotas, células bacterianas, células vegetales o células arqueales. Las células eucariotas de ejemplo pueden ser de origen mamífero, insecto, aviar u otro animal. Las células eucariotas de mamíferos incluyen líneas celulares inmortalizadas, como hibridomas o líneas celulares de mieloma, como SP2/0 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, CRL-1581), NS0 (Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), Salisbury, Wiltshire, RU, ECACC No. 25 85110503), líneas celulares murinas FO (ATCC CRL-1646) y Ag653 (ATCC CRL-1580). Una línea celular de mieloma humano de ejemplo es U266 (ATCC CRL-TIB-196). Otras líneas celulares útiles incluyen las derivadas de células de ovario de hámster chino (CHO) como CHO-K1SV (Lonza Biologics, Walkersville, MD), CHO-K1 (ATCC CRL-61) o DG44.

30 Otra realización de la invención es un procedimiento para hacer que un anticuerpo reaccione con IL-17A que comprende cultivar una célula huésped de la invención y recuperar el anticuerpo producido por la célula huésped. Los procedimientos para producir anticuerpos y purificarlos son bien conocidos en la técnica. Para la expresión, las secuencias de la cadena pesada de la familia 2, 6a, 6b, 19a y 19b pueden incluir una secuencia líder N-terminal tal como MAWVWTLFLMLAAQSIQA (SEQ ID NO: 109). Las secuencias de nucleótidos de ejemplo que codifican la 35 cadena pesada del mAb6785 candidato (familia 19) con una secuencia líder y la forma madura (sin una secuencia líder) se muestran en las SEQ ID NO: 101 y 102, respectivamente. Del mismo modo, para la expresión, las secuencias de la cadena ligera de la familia 2, 6a, 6b anticuerpos de la divulgación pueden incluir una secuencia líder N-terminal como MGVPTQVLGLLLLWLT DARC (SEQ ID NO: 110) y las secuencias de la cadena ligera de la familia 19a y 19b los anticuerpos de la divulgación pueden incluir una secuencia líder N-terminal tal como MAWSPLLLTTLAHCTG SWA (SEQ ID NO: 116). Las secuencias de nucleótidos de ejemplo que codifican la 40 cadena ligera de mAb6785 con codón optimizado con una secuencia líder y la forma madura (sin una secuencia líder) se muestran en las SEQ ID NO: 103 y 104, respectivamente.

45 Otra realización de la invención es una línea celular de hibridoma que produce un anticuerpo de la invención.

Metodos de tratamiento

50 Los antagonistas de IL-17A de la invención, por ejemplo, antagonistas de anticuerpos de IL-17A, pueden utilizarse en cualquier terapia en la que se desee reducir los efectos de IL-17A en el paciente animal. La IL-17A puede estar circulando en el cuerpo o puede estar presente en un nivel indeseablemente alto localizado en un sitio particular del cuerpo, por ejemplo, un sitio de inflamación. Aunque no deseen unirse a ninguna teoría particular, los antagonistas de la invención proporcionan una terapia beneficiosa al prevenir o reducir la unión de IL-17A a su receptor, o la homo o heterodimerización de IL-17A. Los procedimientos de la invención se pueden usar para tratar a un paciente animal que pertenece a cualquier clasificación. Ejemplos de tales animales incluyen mamíferos tales como seres 55 humanos, roedores, perros, gatos y animales de granja.

60 Los anticuerpos de la invención pueden ser útiles para la profilaxis y el tratamiento de afecciones mediadas por IL-17A, tales como afecciones inflamatorias, alergias y afecciones alérgicas, reacciones de hipersensibilidad, enfermedades autoinmunes, infecciones graves y rechazo de trasplantes de órganos o tejidos. Los anticuerpos de la invención también son útiles en la preparación de un medicamento para tal tratamiento, en el que el medicamento se prepara para la administración en dosis definidas en el presente documento. Las afecciones mediadas por IL-17A de ejemplo son afecciones inflamatorias, trastornos inmunitarios y proliferativos, que incluyen artritis reumatoide (AR), espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, artrosis, osteoporosis, uveítis, fibrosis inflamatoria (por ejemplo, esclerodermia, fibrosis pulmonar y cirrosis), intestino inflamatorio trastornos (p. ej., enfermedad de Crohn, colitis 65 ulcerosa y enfermedad inflamatoria intestinal), asma (incluyendo asma alérgica), alergias, EPOC, esclerosis múltiple, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, diabetes y cáncer. Se han descrito resultados positivos en pacientes tratados

con terapias anti-IL-17A humanas en artritis reumatoide, psoriasis y uveítis no infecciosa (Genovese et al., *Arthritis Rheum.* 62: 929-39, 2010; Hueber et al., *Sci. Transl. Med.* 2: 52ra72., 2010).

5 La afección pulmonar inflamatoria es un ejemplo de afección inflamatoria. Las afecciones pulmonares inflamatorias de ejemplo incluyen afecciones pulmonares inducidas por infección que incluyen aquellas asociadas con infecciones virales, bacterianas, fúngicas, parasitarias o priónicas; afecciones pulmonares inducidas por alérgenos; afecciones pulmonares inducidas por contaminantes, como asbestosis, silicosis o beriliosis; Afecciones gástricas inducidas por aspiración, desregulación inmune, afecciones inflamatorias con predisposición genética, como la fibrosis quística, y afecciones pulmonares inducidas por traumatismos físicos, como la lesión por el respirador. Estas afecciones inflamatorias también incluyen asma, enfisema, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), sarcoidosis, histiocitosis, linfangiomatosis, lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda, enfermedad pulmonar crónica, displasia broncopulmonar, neumonía adquirida en la comunidad, neumonía nosocomial, neumonía asociada, sepsis, neumonía viral, infección por influenza, infección por parainfluenza, infección por rotavirus, infección por metapneumovirus humano, infección por virus respiratorio sincitial y aspergillus u otras infecciones fúngicas. Las enfermedades inflamatorias asociadas a infecciones de ejemplo pueden incluir neumonía viral o bacteriana, como neumonía grave, fibrosis quística, bronquitis, exacerbaciones de las vías respiratorias y síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA). Dichas afecciones asociadas con la infección pueden implicar múltiples infecciones, como una infección viral primaria y una infección bacteriana secundaria. La producción desregulada de IL-17A puede jugar un papel en la patología de las enfermedades pulmonares como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (revisada en Alcorn et al., *Annu. Rev. Physiol.* 72: 495-516, 2010). Se ha demostrado que la IL-17A regula la inflamación neutrofílica en los pulmones, una característica del asma grave y la EPOC, debido a la capacidad de la IL-17A para inducir factores importantes en el reclutamiento, la supervivencia y la activación de los neutrófilos de las células epiteliales residentes en el pulmón (por ejemplo, IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF). Los anticuerpos de la presente invención suprimen la secreción de IL-6, IL-8 y GM-CSF de las células epiteliales de pulmón y, por lo tanto, pueden ser beneficiosos en el tratamiento terapéutico o profiláctico de sujetos con afecciones inflamatorias pulmonares, como el asma y la EPOC. Los modelos animales utilizados comúnmente para el asma y la inflamación de las vías respiratorias incluyen el modelo de desafío con ovoalbúmina y los modelos de sensibilización con metacolina (Hessel et al., *Eur. J. Pharmacol.* 293: 401-12, 1995). La inhibición de la producción de citocinas y quimiocinas a partir de células epiteliales bronquiales humanas cultivadas, fibroblastos bronquiales o células del músculo liso de las vías respiratorias también se puede utilizar como modelos *in vitro*. La administración de antagonistas de la presente invención a cualquiera de estos modelos puede usarse para evaluar el uso de esos antagonistas para mejorar los síntomas y alterar el curso del asma, la inflamación de las vías respiratorias, la EPOC y similares.

35 La psoriasis es otro ejemplo de una afección inflamatoria. La psoriasis se caracteriza por una hiperproliferación de queratinocitos mediada por células T y un infiltrado inflamatorio. La inflamación y la hiperproliferación del tejido psoriático se asocian con un perfil histológico, antigénico y de citocinas diferente al de la piel normal. Entre las citocinas asociadas con la psoriasis se encuentran: TNF α , IL-19, IL-18, IL-15, IL-12, IL-7, IFN γ , IL-17A e IL-23 (Gudjonsson y col., *Clin. Exp. Immunol.* 135: 1-8, 2004). IL-17A se ha encontrado sobreexpresado en lesiones psoriásicas (Patente de EE.UU. N.º 7.776.540) y se han descrito resultados positivos en pacientes tratados con terapias IL-17A anti-humanos (Hueber et al., *Sci. Transl. Med.* 2: 52ra72., 2010).

45 La artritis, incluida la artrosis, la artritis reumatoide, las articulaciones artríticas como resultado de una lesión y similares, son afecciones inflamatorias comunes, que se beneficiarían del uso terapéutico de proteínas antiinflamatorias, como los antagonistas de la presente invención. La activación de la señalización de IL-17A puede perpetuar la inflamación y un mayor daño tisular en la articulación inflamada. Se conocen varios modelos animales para la artritis reumatoide. por ejemplo, en el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA), los ratones desarrollan una artritis inflamatoria crónica que se parece mucho a la artritis reumatoide humana. La administración de los anticuerpos IL-17A de la presente descripción a los ratones modelo CIA se puede utilizar para evaluar el uso de estos antagonistas para mejorar los síntomas y alterar el curso de enfermedades.

55 Las afecciones inflamatorias gastrointestinales de ejemplo son la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC), la colitis inducida por lesiones ambientales (por ejemplo, inflamación gastrointestinal (por ejemplo, colitis) causada por o asociada con (por ejemplo, como un efecto secundario) un régimen terapéutico, como la administración de quimioterapia, radioterapia y similares, infecciones por colitis, colitis isquémica, colitis colagenosa o linfocítica, enterocolitis necrotizante, colitis en afecciones como enfermedad granulomatosa crónica o enfermedad celíaca, alimentos Alergias, gastritis, gastritis infecciosa o enterocolitis (por ejemplo, Gastritis crónica activa infectada por *Helicobacter pylori*) y otras formas de inflamación gastrointestinal causada por un agente infeccioso. Existen varios modelos animales para afecciones inflamatorias gastrointestinales. Algunos de los modelos más utilizados son el modelo de colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobenenosulfónico/etanol (TNBS) o el modelo de oxazolona, que induce inflamación crónica y ulceración en el colon (Neurath et al., *Intern. Rev. Immunol* 19: 51-62, 2000). Otro modelo utiliza dextrano sulfato de sodio (DSS), que induce una colitis aguda que se manifiesta por diarrea sanguinolenta, pérdida de peso, acortamiento del colon y ulceración de la mucosa con infiltración de neutrófilos. Otro modelo implica la transferencia adoptiva de ingenuos CD45RB^{alto} Células T CD4 a ratones RAG o SCID. En este modelo, las células T ingenuas del donante atacan el intestino del receptor y causan inflamación intestinal crónica y síntomas similares a las enfermedades inflamatorias del intestino humano (Read and

Powrie, Curr. Protoc. Immunol. Chapter 15 unit 15.13, 2001). La administración de antagonistas de la presente invención en cualquiera de estos modelos puede usarse para evaluar la eficacia potencial de esos antagonistas para mejorar los síntomas y alterar el curso de las enfermedades asociadas con la inflamación en el intestino, como la enfermedad inflamatoria intestinal.

5 La fibrosis renal se puede desarrollar a partir de una lesión aguda (por ejemplo, isquemia/reperfusión del injerto) (Freese y col., Nephrol. Marcar. Trasplante. 16: 2401-6, 2001) o afección crónica (por ejemplo, diabetes) (Ritz et al., Nephrol. Marcar. Trasplante. 11 supl 9: 38-44, 1996). La patogenia se caracteriza típicamente por una respuesta inflamatoria inicial seguida de fibrogénesis sostenida del aparato de filtración glomerular y del intersticio tubular (Liu, Kidney Int. 69: 213-7, 2006). Se ha demostrado que la fibrosis tubulointersticial desempeña un papel crítico en la patogenia de la lesión renal hasta la insuficiencia renal terminal y la célula del túbulo proximal se ha revelado como un mediador central (Phillips y Steadman, Histol. Histopathol. 17: 247-52, 2002; Phillips, Chang Gung Med. J. 30: 2-6, 2007). La fibrogénesis en el compartimento tubulointersticial está mediada en parte por la activación de fibroblastos residentes, que secretan citocinas proinflamatorias que estimulan el epitelio del túbulo proximal para secretar mediadores inflamatorios y fibrogénicos locales. Además, las citocinas quimiotácticas son secretadas por fibroblastos y células epiteliales y proporcionan un gradiente direccional que guía la infiltración de monocitos/macrófagos y células T en el tubulointersitio. El infiltrado inflamatorio produce citocinas fibrogénicas e inflamatorias adicionales que activan aún más la liberación de fibroblastos y citocinas epiteliales, al mismo tiempo que estimulan al epitelio a experimentar una transición fenotípica en la que las células depositan el exceso de componentes de la matriz extracelular (Simonson, Kidney Int. 71: 846-54, 2007). Se ha demostrado que IL-17A está regulada positivamente durante el rechazo del aloinjerto renal humano (Van Kooten y col., J. Am. Soc. Nephrol. 9: 1526-34, 1998; Loong et al., J. Path. 197: 322-32, 2002). IL-17A estimula la producción de los mediadores proinflamatorios IL-6, IL-8, componente del complemento C3 y RANTES por el epitelio tubular proximal (Van Kooten y col., J. Am. Soc. Nephrol. 9: 1526-34, 1998; Woltman y col., J. Am. Nephrol. 11: 2044-55, 2000). Estos factores, a su vez, median el reclutamiento de otros tipos de células inflamatorias en el intersticio que contribuyen al mantenimiento de la respuesta inflamatoria/inmune y, si no se suprimen, la aparición de fibrosis y nefropatía crónica de aloinjerto (Racusen et al., Kidney Int. 55: 713-23, 1999; Mannon, Am. J. Transpl. 6: 867-75, 2006).

30 Otras afecciones fibróticas de ejemplo pueden incluir fibrosis hepática (que incluye, entre otras, cirrosis inducida por alcohol, cirrosis inducida por virus, hepatitis inducida por autoinmunidad); fibrosis pulmonar (incluyendo pero no limitado a la esclerodermia, fibrosis pulmonar idiopática); fibrosis renal (incluyendo, entre otros, esclerodermia, nefritis diabética, nefritis glomerular, nefritis lúpica); fibrosis dérmica (que incluye, entre otras, esclerodermia, cicatrización hipertrófica y queloides, quemaduras); mielofibrosis; neurofibromatosis; fibroma; fibrosis intestinal; y adhesiones fibróticas resultantes de procedimientos quirúrgicos. La fibrosis puede ser fibrosis específica de órgano o fibrosis sistémica. La fibrosis específica del órgano puede estar asociada con fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis cardíaca, fibrosis vascular, fibrosis de la piel, fibrosis ocular o fibrosis de la médula ósea. La fibrosis pulmonar se puede asociar a fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar inducida por fármacos, asma, sarcoidosis o enfermedad pulmonar obstructiva crónica. La fibrosis hepática puede estar asociada con cirrosis, schistomasomiasis o colangitis. La cirrosis se puede seleccionar de la cirrosis alcohólica, post-hepatitis C cirrosis, cirrosis biliar primaria. La colangitis puede ser colangitis esclerosante. La fibrosis renal puede estar asociada con nefropatía diabética o glomerulosclerosis lupus. La fibrosis cardíaca puede asociarse con infarto de miocardio. La fibrosis vascular puede estar asociada con la restenosis arterial postangioplastia o aterosclerosis. La fibrosis de la piel puede estar asociada con la cicatrización quemadura, cicatrices hipertróficas, queloides, o dermatopatía fibrosante nefrogénica. La fibrosis ojo puede estar asociada con fibrosis retro-orbital, la cirugía postcataract o vitreoretinopatía proliferativa. La fibrosis de la médula ósea puede estar asociada con mielofibrosis idiopática o mielofibrosis inducida por fármacos. La fibrosis sistémica puede ser esclerosis sistémica o enfermedad injerto contra huésped.

50 Otras afecciones y neuropatías inflamatorias, que pueden ser prevenidas o tratadas por los procedimientos de la invención son aquellas causadas por enfermedades autoinmunes. Estas afecciones y neuropatías incluyen esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso, neurodegenerativo y trastornos del sistema nervioso central (SNC) que incluyen la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, trastorno bipolar y esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedades hepáticas que incluyen cirrosis biliar primaria, cirrosis Colangitis esclerosante, enfermedad del hígado graso no alcohólico/esteatohepatitis, fibrosis, virus de la hepatitis C (VHC) y virus de la hepatitis B (VHB), diabetes y resistencia a la insulina, trastornos cardiovasculares que incluyen aterosclerosis, hemorragia cerebral, infarto cerebral e infarto de miocardio, artritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica y artritis reumatoide juvenil (ARJ), osteoporosis, osteoartritis, pancreatitis, fibrosis, encefalitis, psoriasis, arteritis de células gigantes, espondilitis anquilosante, hepatitis autoinmune, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), enfermedades inflamatorias de la piel, trasplantes, cáncer, alergias Enfermedades endocrinas, reparación de heridas, ot. sus trastornos autoinmunes, hiperreactividad de las vías respiratorias e infecciones o trastornos de las células, los virus o los priones.

Administración/Composiciones Farmacéuticas

65 La "cantidad terapéuticamente eficaz" del agente efectivo en el tratamiento de afecciones en las que la supresión de la actividad de la IL-17A es deseable se puede determinar por técnicas de investigación estándar. por ejemplo, la

dosis del agente que será eficaz en el tratamiento de una afección inflamatoria como el asma, la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa o la artritis reumatoide se puede determinar administrando el agente a modelos animales relevantes, como los modelos descritos en el presente documento.

5 Adicionalmente, opcionalmente se pueden usar ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La selección de una dosis eficaz particular puede determinarse (por ejemplo, a través de ensayos clínicos) por los expertos en la técnica basándose en la consideración de varios factores. Tales factores incluyen la enfermedad a tratar o prevenir, los síntomas involucrados, la masa corporal del paciente, el estado inmune del paciente y col. factores conocidos por los expertos en la técnica. La dosis precisa que se empleará en la formulación
10 también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad, y debe decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de *in vitro* o modelos de prueba en animales.

15 El modo de administración para uso terapéutico del agente de la invención puede ser cualquier ruta adecuada que suministre el agente al huésped. Las composiciones farmacéuticas de estos agentes son particularmente útiles para la administración parenteral, por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea o intranasal.

20 El agente de la invención se puede preparar como composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad eficaz del agente como ingrediente activo en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto activo. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua y aceites, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. por ejemplo, 0,4 % de solución salina y 0,3 % de glicina se pueden usar. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de
25 partículas. Se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, bien conocidos (por ejemplo, filtración). Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste y tamponamiento del pH, agentes estabilizantes, espesantes, lubricantes y colorantes, etc. La concentración del agente de la invención en dicha formulación farmacéutica puede variar ampliamente. *es decir.*, desde menos de aproximadamente el 0,5 %,
30 generalmente en o al menos aproximadamente el 1 % hasta tanto como 15 o 20 % en peso y se seleccionará principalmente en función de la dosis requerida, los volúmenes de fluidos, las viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.

35 Por lo tanto, una composición farmacéutica de la invención para inyección intramuscular podría prepararse para contener 1 ml de agua tamponada estéril, y entre aproximadamente 1 ng y aproximadamente 100 mg. *p.ej.* de aproximadamente 50 ng a aproximadamente 30 mg o más preferiblemente, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25 mg, de un antagonista de anticuerpo de la invención. De manera similar, una composición farmacéutica de la invención para infusión intravenosa podría prepararse para contener aproximadamente 250 ml de solución de Ringer estéril, y de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 30 mg y preferiblemente de 5 mg a
40 aproximadamente 25 mg de un antagonista de la invención. Los procedimientos reales para preparar composiciones administrables por vía parenteral son bien conocidos y se describen con más detalle, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Science", 15ª edición, Mack Publishing Company, Easton, PA.

45 Los antagonistas de anticuerpos de la invención se pueden liofilizar para el almacenamiento y reconstituir en un vehículo adecuado antes de su uso. Se ha demostrado que esta técnica es efectiva con inmunoglobulinas y preparaciones de proteínas convencionales y se pueden emplear técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica.

50 La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos específicos, no limitativos.

Ejemplo 1

Identificación de mAb antagonistas anti-IL-17A humana

55 Se usó la biblioteca de presentación en fagos MorphoSys Human Combinatorial Antibody (HuCAL®) Gold (Morphosys AG, Martinsried, Alemania) como fuente de fragmentos de anticuerpos humanos y se realizó una selección de la muestra en subgrupos en solución. En la primera ronda de selección, las sub-bibliotecas se seleccionaron contra la variante de IL-17A A132Q y A70Q madura y biotinilada (IL-17Amut6) (SEQ ID NO: 106). En la segunda ronda, la salida amplificada de la ronda 1 se seleccionó frente a IL-17Amut6 marcada con His6
60 biotinilada en presencia o ausencia de otros miembros de la familia de IL-17A como competidores del sesgo contra anticuerpos que eran específicos de IL-17A. La salida amplificada de la ronda 2 se dividió en dos grupos. La primera agrupación se panoramizó como en la ronda 1. Los clones de la segunda agrupación se diversificaron aún más en HCDR2 o LCDR3, dependiendo de la sub-biblioteca utilizada en las selecciones iniciales, y luego se llevaron a cabo 2 rondas adicionales de panorámica contra IL-17Amut6 para obtener una segunda fuente de clones para el cribado.
65 Los Fab de los lisados de los clones se capturaron en pocillos de placas ELISA recubiertos con anticuerpo Fd antihumano de oveja y se seleccionaron para determinar su unión a IL-17Amut6 biotinilado. Se analizaron lisados

brutos de clones positivos para determinar la inhibición de la unión de IL-17Amut6 al receptor IL-17RA humano recombinante (SEQ ID NO: 107).

5 Los clones seleccionados se eligieron para una caracterización adicional como Fab purificados en función de la puntuación de la secuencia, la afinidad y la representación de todas las familias de secuencias, y se designaron con números MOR. Se generaron variantes adicionales para MOR7708, MOR7785, MOR7706, MOR7775 y MOR7700 para reemplazar Trp o Met que residen en HCDR2, HCDR3 o LCDR3. La tabla 3 muestra las variantes generadas.

Tabla 3.

Familia	N.º MOR parental	N.º de variante MOR	Sustituciones		
			HCDR2	HCDR3	LCDR3
2	Mor7708	Mor8297	W57T		
		Mor8298	W57Y		
	MOR7785	Mor8104	W57T		
		MOR8105	W57Y		
6b	MOR7706	MOR8299		M106I	
		MOR8300		M106L	
		MOR8301		M106T	
	MOR7775	MOR8101		M106I	
		Mor8102		M106L	
		Mor8103		M106T	
19a	MOR7700	MOR8095	M53I		
		MOR8096	M53L		
		MOR8097		M101L	
		MOR8098		M101T	
		Mor8141			M96L
		Mor8142			M96T
		MOR8143			M96Y
		MOR8160		M101T	M96L
		MOR8161		M101T	M96T
		MOR8162		M101T	M96Y
		Mor8302	M53L	M101T	
Mor8303	M53L	M101T	M96T		

10

Los Fab fueron analizados para determinar su inhibición de la unión de IL-17Amut6 y cynoIL-17A al receptor de IL-17RA humano recombinante, y su unión a IL-17Amut6. Todos los Fab probados inhibieron la unión de IL-17Amut6 y cynoIL-17A a la IL-17RA. La afinidad de los Fab a IL-17Amut6 se midió utilizando el ensayo SET (Tabla 4). De los Fab identificados, los candidatos de las familias 2, 6a, 6b, 19a y 19b fueron seleccionados para una mayor caracterización.

15

Tabla 4

Familia	N.º MOR	K _D (SET) (pM)	Familia	N.º MOR	K _D (SET) (pM)
2	7702	11	19a	7700	30
	7701	45		8095	77
	7708	90		8096	28
	7785	6		8097	69
	8104	150		8098	47

Familia	N.º MOR	K _D (SET) (pM)		Familia	N.º MOR	K _D (SET) (pM)
	8105	130			8141	30
	7786	20			8142	90
6b	7706	90			8143	130
	7775	44			8160	70
	8101	150				
	8102	130				
	8103	89				

Ejemplo 2

5 **Derivación, ingeniería y caracterización de mAb antagonistas anti-IL-17A**

Los Fab N.º MOR seleccionados se convirtieron y expresaron como mAb en un formato de IgG1 humano, y se les dio la designación correspondiente de MORmAb. Los MORmAb generados se analizaron para determinar la expresión y la agregación, su capacidad para inhibir la unión de IL-17A humana y cínica a IL-17RA humana y la secreción de IL-8 de células NHDF. La Tabla 5 muestra los valores de CI50 para ensayos seleccionados para los MORmAbs. Ninguno de los MORmAb probados (ab. N.º MOR 7702, 7708, 7785, 7786, 7706, 7775, 7700, 8095, 8096, 8097, 8098, 7768) reaccionó con otros miembros de la familia IL-17.

Tabla 5

Familia	AB N.º MORM	IL-17 humana, CI50 (pM)		Cyno IL-17, CI50 (pM)
		Inhibición IL-17RA	Secreción de IL-8	Inhibición IL-17RA
2	7702	297	6214	209
	7708	284	398	289
	7785	172	196	270
	8104	204	512	306
	8105	538	1168	498
	7786	140	368	59
6b	7706	378	402	961
	7775	138	2244	541
	8101	108	1907	845
	8102	186	24520	838
	8103	167	929	491
19a	7700	99	70	236
	8095	130	121	198
	8096	189	75	58
	8097	178	84	300
	8098	225	146	289
	8141	117	67	1435
	8142	129	79	139
	8143	191	61	252
	7768	456	229	388

Diseño e marco de mAb antagonistas anti-IL-17A

Basados en la actividad y las propiedades biofísicas y bioquímicas, los MORmAb seleccionados se diseñaron en sus regiones variables para cambiar ciertos residuos del marco a los presentes en una línea germinal humana correspondiente y para cambiar los codones a los que ocurren con mayor frecuencia en proteínas de mamíferos altamente expresadas. En la familia 2 se realizaron sustituciones VL, L11V y V85T (secuencia lineal), convirtiendo el marco en una coincidencia exacta con la línea germinal VK-1 Vb-L5 (IGKV1-12 * 01). Una región variable de ejemplo con las sustituciones V11V y V85T es la región variable que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 76. En la familia 6a y 6b se hicieron sustituciones VL, D1E, V59I y T86V (secuencia lineal), convirtiendo el marco para coincidir exactamente con la línea germinal Vk-3 Vb-L6 (IGKV3-11 * 01). Una región variable de ejemplo con las sustituciones D1E, V59I y T86V es la región variable que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 77. En la familia 6a y 6b VH, se realizó una sustitución G44S (secuencia lineal) para que coincida con la Vh- 6 línea germinal Vb 6-01 (IGHV6-1 * 01). Una región variable de ejemplo con la sustitución G44S es la región variable que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 81. En la familia 19a y 19b VL, los aminoácidos 1-3 (DIE) se sustituyeron con QSV para reemplazar la kappa N artificial - Termino con el de una cadena lambda. Una región variable de ejemplo con la sustitución QSV es una región variable que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 79. En la familia 19a y 19b VH, se realizó una sustitución V5L para dar una coincidencia cercana a la línea germinal Vh-3 Vb 3-23 (IGHV3-23 * 01). Además, en este proceso se sustituyeron los residuos de la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada 353-357 (REEMT) con RDELTA. Una región variable de ejemplo con la sustitución V5L es una región variable que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 86. Un ejemplo de cadena pesada con la región constante 353-357 REEMT - > RDELTA es una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 100. Los anticuerpos modificados se dieron números mAb.

Las designaciones correspondientes y las listas de secuencias de las regiones variables originales y de ingeniería y los anticuerpos de longitud completa se enumeran en la Tabla 2. Las secuencias de las CDR dentro de cada familia se muestran en la Figura 1.

Los mAb diseñados se caracterizaron como se describió anteriormente para los MORmAbs. Los valores de CI50 (pM) medidos usando los ensayos indicados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Familia	N.º mAb	CI50 (pM), IL-17A humana			CI50 (pM), cynoIL-17A		
		Inhibición de IL-17RA	Producción de IL-8	Producción de IL-6	Inhibición de IL-17RA	Producción de IL-8	Producción de IL-6
2	mAb624	78	687	234	51	192	687
	mAb3077	118	292	37	54	374	113
	mAb7024	185	693	412	117	2979	999
6b	mAb4538	229	1483	264	636	1754	847
	mAb3584	195	2388	370	489	1253	823
	mAb732	327	2607	560	463	12527	2017
	mAb4168	266	4878	732	764	3301	2172
19a	mAb1926	108	62	35	53	105	67
	mAb7146	143	71	40	67	140	139
	mAb6785	172	95	45	76	563	193

La afinidad de mAb seleccionados se evaluó utilizando Biacore. Los resultados de las mediciones se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Unión a IL-17A mut6 humana				
Anticuerpo	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)	Estequiometría *
mAb7146	$4,67 \times 10^6$	$5,57 \times 10^{-5}$	12	2,1
mAb6785	$3,80 \times 10^6$	$6,98 \times 10^{-5}$	18	2,1
Fab6486	$3,14 \times 10^6$	$1,23 \times 10^{-4}$	39	1,1

Unión a IL-17Amut6 humana				
Anticuerpo	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)	Estequiometría *
mAb5548	$3,63 \times 10^6$	$1,45 \times 10^{-4}$	40	2,1
mAb 1926	$4,43 \times 10^6$	$3,41 \times 10^{-5}$	8	2,1
Unión a IL-17 ^a de cino				
Anticuerpo	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_D (s^{-1})	K_D (pM)	Estequiometría *
mAb7146	$2,23 \times 10^6$	$1,12 \times 10^{-4}$	50	2
mAb6785	$1,80 \times 10^6$	$2,67 \times 10^{-4}$	148	2,2
Fab6486	$1,60 \times 10^6$	$3,28 \times 10^{-4}$	205	1,1
mAb5548	$1,61 \times 10^6$	$3,62 \times 10^{-4}$	225	1,9
mAb 1926	$2,77 \times 10^6$	$5,11 \times 10^{-5}$	18	2,3
* dímeros por anti-IL-17				

5 **El anticuerpo anti-IL-17 inhibe la secreción de citocinas en células NHBE**

Se ha demostrado que IL-17A regula la inflamación neutrofílica en los pulmones, un sello distintivo del asma grave, así como la EPOC, debido a la capacidad de IL-17A para inducir factores importantes en el reclutamiento, la supervivencia y la activación de los neutrófilos (por ejemplo, IL-6, IL-8, GM-CSF). Para determinar si los anticuerpos anti-IL-17A de la invención pueden inhibir los cambios inducidos por IL-17A en células residentes de pulmón, se estimularon células epiteliales bronquiales humanas normales (NHBE) con IL-17A humana durante 48 horas en presencia de mAb6785. mAb6785 inhibió la producción de IL-6A inducida por IL-17A y GM-CSF por células NHBE con $CI_{50} = 619,0 \pm 64,0$ pM y 564 ± 86 pM, respectivamente.

15 **El anticuerpo anti-IL-17 inhibe la actividad biológica del heterodímero IL-17A/F**

Se sembraron células de fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF; Lonza) en una placa de cultivo de tejidos de fondo plano de 48 pocillos a 10.000 células por pocillo en FGM₂ Medio (Lonza) e incubado durante la noche (37 °, 5 % CO₂). Después de la incubación, se preincubó una concentración final de 50 ng/ml (1.47 nM) de heterodímero rhIL-17A/F (R&D Systems) con una serie de dilución (30 pg/mL - 0.5 ng/mL) de mAb6785 o anticuerpos de control para 10 Minutos a temperatura ambiente, y añadidos a las células. Las células se incubaron durante 48 h (37 °, 5 % de CO₂) y los sobrenadantes de los cultivos se recogieron y analizaron mediante ELISA para determinar el contenido de IL-6 utilizando los conjuntos de dúos de IL-6 humanos (R&D Systems, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de CI_{50} se determinaron mediante regresión no lineal utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc). mAb6785 inhibió la producción de IL-6 inducida por el heterodímero IL-17A/F por NHDF con $EC_{50} 2 \pm 2,5$ nM.

Procedimientos

30 **Determinación de las afinidades en picomoles mediante la valoración de equilibrio de la solución (SET)**

Para la determinación de K_D mediante valoración en equilibrio de la solución (SET), se usaron fracciones de monómero (al menos 90 % de contenido de monómero, analizadas por SEC analítica; columna Superdex75, GE) de la proteína Fab.

La determinación de la afinidad basada en la electroquimioluminiscencia (ECL) en la solución y la evaluación de los datos se realizaron básicamente como se describe anteriormente (Haenel et al., Anal Biochem 339: 182-4, 2005). Se incubó una concentración fija definida de Fab purificado (~10-100 pM) con concentraciones crecientes de IL-17Amut6 (concentración más alta de 5 nM) en solución hasta que se alcanzó el equilibrio químico. Para cuantificar el Fab no unido en solución, las muestras se transfirieron a una placa de microtitulación de estreptavidina MSD de 384 pocillos (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) con IL-17Amut6 recubierto biotinilado. Para la detección, se aplicó un anticuerpo Fab/IgG antihumano marcado con complejo de rutenio y las placas se leyeron con el Sector TM Imager 6000 (MSD). Las curvas de titulación (concentración de Fab libre en función de la concentración de antígeno) se trazaron y se ajustaron con el software Excel/XLfit utilizando el modelo que se describe a continuación.

Para la evaluación de datos para K_D Para determinar las moléculas Fab, se utilizó el siguiente modelo de ajuste (modificado de acuerdo con Abraham et al. J Mol Reconocimiento. 9: 456-461, 1996):

$$y = B_{max} - \frac{B_{max}}{(2 * c_{Fab}) * (x + c_{Fab} + K_D - \sqrt{(x + c_{Fab} + K_D)^2 + (x + c_{Fab} + K_D) - 4 * x * c_{Fab}}))}$$

Mientras:

5 B_{max} : señal de unión máxima (a concentración de antígeno = 0)

c_{Fab} : concentración de Fab aplicada

x: concentración de antígeno soluble total aplicada (sitios de unión) sqrt: raíz cuadrada

10

K_D : Constante de disociación de equilibrio

Inhibición de la unión de IL-17A a IL-17RA (por ejemplo, ensayo de "inhibición de IL-17RA"

15 Las placas transparentes maxisorp se recubrieron con 100 μ l/pocillo de 2,5 μ g/ml de IL-17RA-Fc humana (R&D Systems, Minneapolis, MN) en tampón de bicarbonato de carbonato de sodio 0,1 M, pH 9,4 y se incubaron durante la noche a 4°C. Después del bloqueo y los lavados, se preincubaron 25 ng/ml de IL-17mut6 humana biotinilada (SEQ ID NO: 106) o IL-17A de cynomolgus (SEQ ID NO: 108) con mAb probados o mAb de control (30 a 0 μ g/Concentración final de ml) en un volumen combinado de 100 μ l durante 5-10 minutos, y luego se agrega a las
20 placas. La señal se detectó con 100 μ l de dilución 1: 10.000 de 1 mg/ml de SA-HRP (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) durante 20 minutos a temperatura ambiente (RT), seguido de 100 μ l/pocillo de sustrato OPD (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO). Las placas se leyeron a 492 nm (Envision, PerkinElmer, Waltham, MA). La unión de Fab a IL-17RA se probó como se describe para los mAb.

Inhibición de la producción de IL-8 e IL-6 a partir de células NHDF (por ejemplo, ensayos de "producción de IL-8" y "producción de IL-6")

El efecto de la inhibición de mAb anti-IL-17A sobre la producción de IL-8 e IL-6 se evaluó en fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF). Las células se colocaron en una placa de cultivo de tejidos de fondo plano de 48 pocillos a 0,1 x 10⁵ células por pocillo, 250 μ l por pocillo en medio FGM-2 e incubadas durante la noche (37 °, 5 % de CO₂). Después de la incubación, se añadieron 0,1 ng/ml de TNF- α humano a todos los pocillos. 10 ng/ml de IL-17mut6 o 25 ng/ml de cynomolgus IL-17A se preincubó con mAb probados o mAb de control (30-0 μ g/ml de concentración final) en un volumen combinado de 250 μ l durante 10 minutos a temperatura ambiente, y Luego se agrega a 250 μ l de células. En los ensayos, se incluyeron muestras de IL-17mut6 sin anticuerpo agregado como
30 muestras de control, mientras que las muestras que consistían en TNF- α o medio de cultivo solo se incluyeron como controles negativos. Las células se incubaron durante 24 horas (37 °, 5 % de CO₂) y los medios acondicionados se recogieron y analizaron mediante ELISA para IL-6 e IL-8 utilizando IL-6 e IL-8 ELISA Duo Sets humanos de acuerdo con las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los Fab se ensayaron como se describe para los mAbs.

40

Inhibición de la producción de IL-6 y G-CSF a partir de células NHBE

Se sembraron células epiteliales bronquiales humanas normales (NHBE; Lonza) a 20.000 células por pocillo en medio BEGM (Lonza) y se incubaron durante la noche (37 °, 5 % de CO₂). Después de la incubación, las células se estimularon con IL-17A mut6 durante 48 horas en presencia de los anticuerpos probados en un intervalo de concentraciones (30 pg/ml – 0,5 ng/ml). Los sobrenadantes se recogieron después de la incubación y se analizaron para determinar el contenido de IL-6 o G-CSF utilizando un ELISA específico para IL-6 o G-CSF humano (R&D Systems, Inc.). Los valores de CI50 se determinaron mediante regresión no lineal utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc).

50

Reactividad cruzada con miembros de la familia IL-17A

Las placas transparentes maxisorp se recubrieron con 100 μ l/pocillo de mAb de 5 μ g/ml o mAb de control de isotipo en PBS, y se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con 200 μ l/pocillo durante 1 hora con tampón de bloque ELISA (BSA al 1 %, sacarosa al 5 % en PBS con NaN al 0,05 %).³) y se lavó tres veces con tampón de lavado (PBS, Tween-20 al 0,01 %). Las citocinas competidoras se valoraron en tampón diluyente de ensayo (BSA al 1 % en PBS) a una concentración final 2x, y se preparó citocina biotinilada a una concentración final 2x. Se mezclaron 100 μ l de citocinas a 2x concentración final (30-0 μ g/ml de concentración final) con 100 μ l de IL-17mut6 biotinilado a 2x concentración final (25 ng/ml de concentración final) en un tampón de ensayo. Se usó IL-23 humana recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN) como control negativo, muestra de tampón solo como control de fondo, e IL-17mut6 como control positivo. Se añadieron a la placa 100 μ l por pocillo por duplicado de la mezcla de citocina/IL-17mut6 biotinilada y se incubaron durante 1-2 horas. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado y se incubaron con 100 μ l de dilución 1: 10.000 de 1 mg/ml de SA-HRP (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces

60

con tampón de lavado ELISA. Después del lavado, se agregaron a cada pocillo 100 µl/pocillo de sustrato OPD (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) y se incubaron hasta que se detectó el cambio de color apropiado. La reacción se detuvo con la adición de 50 l de ácido sulfúrico 2 N, y se leyeron las placas 492 nm utilizando el instrumento Envision.

5

Medidas de afinidad - Ensayo de Biacore

Las mediciones de afinidad utilizando resonancia de plasmón superficial (SPR) se realizaron utilizando un biosensor óptico Biacore 3000 (Biacore). Los Fabs seleccionados (~30 RU) o los mAb (~50 RU) se capturaron en la superficie del chip sensor utilizando un anticuerpo de oveja anti-Fd o un anticuerpo anti-humano Fc para la captura de Fab o mAb, respectivamente. La captura de Fab o mAb fue seguida por la inyección de huLL-17mut6 o cino IL-17A en solución (0,2 a 49 nM).

10

Ejemplo 4

15

Mapeo de epítomos

Los epítomos de anticuerpos se dedujeron mediante una combinación de unión competitiva, análisis de intercambio H/D y coestructura del anticuerpo-IL-17A (véase el Ejemplo 5). Se utilizaron los siguientes anticuerpos: mAb1926, MORmAb7700, MORmAb7706, MORmAb7708, mAb7357 (un anticuerpo neutralizante de IL-17A anti-humano de ratón derivado del hibridoma C1863), mAb2832 (un anticuerpo neutralizador de IL-17A anti-humano de ratón/humano derivado de hibridoma C1861), mAb317 (anticuerpo anti-humano IL-17A de ratón, R&D Systems, Minneapolis, MN) y mAb3171 (anticuerpo anti-humano de ratón IL-17A, R&D Systems, Minneapolis, MN) y mAbEbio16-7178 (un anti-ratón anticuerpo IL-17A humana, e-Bioscience, San Diego, CA). Los tres anticuerpos comerciales mostraron diversos grados de actividad neutralizadora.

20

25

Unión competitiva de epítomos

Para ELISA competitivo, se recubrieron 5 µl (20 µg/ml) de proteína IL-17Amut6 en una placa MSD HighBind (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) por pocillo durante 2 horas a temperatura ambiente. Se agregaron 150 µl de 5 % de tampón MSD Blocker A (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con tampón HEPES 0,1 M (pH 7,4). El anticuerpo marcado (colorante de fluorescencia MDS), 10 nM, se incubó con concentraciones crecientes de anticuerpos competidores (1 nM - 2 µM) y se agregaron 25 µl de la mezcla a los pocillos designados. Después de 2 horas de incubación con agitación suave a temperatura ambiente, las placas se lavaron como antes, se agregaron 150 µl de MSD Read Buffer T diluido y las placas se leyeron con un MDS Sector Imager 6000.

30

35

Los ensayos se llevaron a cabo con mAb1926 marcado, mAb317, mAb3171 o mAb7357 (Figura 4). Según los ensayos de competición, los anticuerpos anti-IL-17A se asignaron a cuatro bandejas diferentes. Bin A: mAb1926, MORmAb7706, y MORmAb7708; Bandeja B: eBio16-7178 y mAb7357; Bandeja C: mAb317; Papelera D: mAb3171.

40

Análisis de intercambio H/D:

Para el intercambio de H/D, el procedimiento utilizado para analizar la perturbación del anticuerpo fue similar al descrito anteriormente (Hamuro et al., J. Biomol. Técnicas, 14: 171-82, 2003; Horn et al., Bioquímica, 45: 8488-98, 2006) Con alguna modificación. Se incubó IL-17Amut6 recombinante (expresado en células HEK293E con etiqueta His C-terminal) en una solución de agua deuterada durante tiempos predeterminados que dieron como resultado la incorporación de deuterio a átomos de hidrógeno intercambiables. El IL-17Amut6 deuterado se capturó en una columna que contenía mAb anti-IL-17A individuales inmovilizados y luego se lavó con tampón acuoso. La proteína IL-17Amut6 de intercambio posterior se eluyó de la columna y la localización de los fragmentos que contenían deuterio se determinó mediante digestión con proteasas y análisis de especificaciones de masa. Regiones unido al anticuerpo se infiere a ser esos sitios relativamente protegido del intercambio y que contienen de este modo una fracción mayor de deuterio, en comparación con IL-17Amut6 no complejo con anticuerpos. Los mapas de perturbación de intercambio H/D de IL-17Amut6 se muestran en la Figura 5. Los números en la parte superior de las barras se refieren a los resultados de IL-17Amut6.

45

50

55

MORmAb7700, MORmAb7706 y MORmAb7708 mostraron diversos grados de cambio diferencial para tres segmentos de IL-17A (SEQ ID NO: 105)₄₅NRSTSPWNLH₅₄ (SEQ ID NO: 159),₅₆NEDPERYPSVIWE₆₈ (SEQ ID NO: 157) y ₁₀₀RREPPHCPNSFRLEKIL₁₁₆ (SEQ ID NO: 158), lo que indica protección por los anticuerpos. los ₅₆NEDPERYPSVIWE₆₈ (SEQ ID NO: 157) fragmento fue fuertemente protegido por MORmAb7708, débilmente protegida por MORmAb7700, y no está protegida por MORmAb7706. El solapamiento en los patrones de protección de fragmentos de estos anticuerpos es consistente con su inhibición cruzada en los ensayos de competición descritos anteriormente.

60

Tanto para mAb7357 como para mAbEbio16-7178, se observó una fuerte protección para ₇₁CRHLGCINADGNVDYHM₈₇ (SEQ ID NO: 160) de acuerdo con su inhibición cruzada en los ensayos de

65

competición descritos anteriormente. Se observó un intercambio diferencial débil, y por lo tanto no concluyente, para otros fragmentos con mAb7357, mAb2832, mAb317 y mAb3171.

5 Los estudios de intercambio H/D localizaron los sitios de enlace para dos de los cuatro grupos de competencia definidos anteriormente. Los anticuerpos bin A (MORmAb7700, MORmAb7706 y MORmAb7708) se unen en la región de los segmentos peptídicos $_{45}\text{NRSTSPWNLH}_{54}$, (SEQ ID NO: 159), $_{56}\text{NEDPERYPSVIWE}_{68}$ (SEQ ID NO: 157) y $_{100}\text{RREPPHPCNSFRLEKIL}_{116}$ (SEQ ID NO: 158), de la SEQ ID NO: 105, y los anticuerpos Bin B (mAb7357 y mAbBio16-7178) unido en la región de segmento peptídico $_{71}\text{CRHLGCINADGNVDYHM}_{87}$ (SEQ ID NO: 160). mAb317 y mAb3171 se unen a sitios distintos entre sí y de los anticuerpos bin A y bin B. Sin embargo, las señales débiles en los estudios de intercambio H/D con ambos anticuerpos no proporcionaron pruebas suficientes para localizar sus epítotos en IL-17A.

Ejemplo 5

15 Estructura cocrystal de IL-17A y anticuerpo anti-IL-17A

La coestructura de IL-17A mut6 con Fab6468, un Fab recombinante etiquetado con His6 de mAb6785, se determinó mediante cristalografía de rayos X. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Fab6468 se muestra en la SEQ ID NO: 90, y la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada se muestra en la SEQ ID NO: 111. En el Ejemplo 5, los residuos de aminoácidos de IL-17A referidos indican residuos según la SEQ ID NO: 105, y los residuos Fab6468 referidos indican residuos de la región variable de la cadena ligera según la SEQ ID NO: 79 y residuos de la región variable de la cadena pesada según la SEQ ID NO: 86. La expresión, el repliegamiento y la purificación del recombinante se ha descrito IL-17A mut6 humana (Wu et al., Cytokine, ePub antes de imprimir Jul29). Fab6468 se expresó en células HEK-293F y se purificó utilizando un procedimiento similar al descrito (Zhao et al., Protein Expr Purif, 67: 182-9, 2009).

Cristalización del complejo IL-17A/Fab6468

30 El complejo IL-17A/Fab6468 se preparó mezclando IL-17A mut6 y Fab6468 en una relación molar de 1: 1.1 en MES 20 mM, pH 6.5, NaCl 0.2 M y glicerol al 10 % y se incubó durante la noche a 4 ° C. El complejo se purificó a partir de un exceso de Fab no complejado utilizando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) en una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, Piscataway, NJ) en MES 20 mM, pH 6,5, NaCl 0,2 M y glicerol al 10 %. Las fracciones correspondientes al complejo se agruparon y se concentraron con un dispositivo Amicon Ultra 10000 MWCO a 4,6 mg/ml.

35 La detección automática de la cristalización se realizó con el robot automático de cristalización de proteínas Oryx4 (Douglas Instruments, East Garston, Reino Unido) dispensar volúmenes iguales de proteína y solución de reservorio en un formato de gota sentada utilizando la placa Corning 3550 (Corning Inc., Corning, NY). La selección inicial se realizó con HT Hampton Crystal Screen (HR2-130, Hampton Research) y cristales aciculares producidos a partir de una serie de condiciones que contienen sulfato de amonio, PEG a pH 4.5 a 4.6. Estos pequeños cristales se utilizaron para producir un stock de semillas para el examen de matriz de micro semillas (MMS) (D'Arcy et al., Acta Crystallographica Sección D, 63: 550-4, 2007). Se obtuvieron cristales de calidad de difracción a partir de la pantalla de MMS en acetato de sodio 0,1 M a pH 5,5, PEG MME 5000 al 12 % y sulfato de litio 0,2 M.

45 Recolección de datos de rayos X del complejo IL-17A/Fab6468

Para la recopilación de datos de rayos X, el cristal se empapó durante unos segundos en el licor madre suplementado con un 24 % de glicerol, y se congeló rápidamente en la corriente de nitrógeno a 95 ° K. Los datos de difracción de rayos X se recolectaron y procesaron utilizando un generador de rayos X con microfoco Rigaku MicroMax TM -007HF equipado con una óptica confocal Osmic TM VariMax TM, un detector CCD Saturn 944 y un sistema de enfriamiento frío X-stream TM 2000 (Rigaku, Woodlands, TX). Las intensidades de difracción se detectaron en una rotación de cristales de 254 ° con un tiempo de exposición de 3 minutos por imagen de medio grado a la resolución máxima de 2.2 Å. Los datos de rayos X se procesaron con el programa D * TREK (Pflugrath, J., Acta Crystallographica Sección D, 55: 1718-25, 1999). El cristal pertenecía al grupo espacial monoclinico P2₁ con a = 73.40 Å, b = 64.04 Å, c = 145.61 Å y $\beta = 95.39^\circ$. Las estadísticas de datos de rayos X se dan en la Tabla 8.

60

65

Tabla 8

Longitud de onda (Å)	1,5418	
Temperatura (K)	95	
Rango de rotación (°)	254	
Grupo espacial	P2 ₁	
Ejes de célula unitaria (Å)	73,40, 64,04, 145,61	
Ángulos celulares unitarios (°)	90, 95,39, 90	
Moléculas/unidad asimétrica	Dímero IL-17 + 2 Fabs	
V _m (Å ³ / Da)	2,76	
Contenido de disolvente (%)	55	
Resolución (Å)	73-2,2	(2,28-2,20)*
n.º reflexiones medidas	251,653	(16,276)
n.º reflexiones únicas	61,776	(5,947)
Complejidad (%)	89,8	(86,9)
Redundancia	4,1	(2,7)
R-fusión	0,151	(0,353)
<I/σ>	5,6	(1,9)
Factor B (Wilson) (Å ²)	33,3	
* Los valores para la cubierta de mayor resolución están en () 's.		

Determinación de estructura

5 La estructura cristalina de IL-17A/Fab6468 se determinó mediante reemplazo molecular utilizando Phaser (Lea, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 57: 1373-82, 2001). Los modelos de búsqueda fueron IL-17F (ID PDB 1JPY) (Hymowitz et al., EMBO J., 20: 5332-41, 2001) y un modelo de homología para el Fv (VH/VL), que se construyó basándose en el anticuerpo anti-IL-13 CNT0607 (ID PDB 3G6A) (Teplyakov y col., J. Mol. Biol. 389: 115-23, 2009)

10 para VH y VL, usando Modeller (Accelrys, CA). Los dos dominios constantes CL/CH1 se tomaron de PDB ID 8FAB (Strong et al., Bioquímica, 30: 3739-48, 1991). El refinamiento de la estructura se realizó con PHENIX (Adams y col., J. Synchrotron. Radiat. 11: 53-5, 2004). La doble simetría no cristalográfica se impuso inicialmente en etapas tempranas de refinamiento, pero se relajó en las etapas finales basadas en R_{gratis}. El ajuste del modelo y la reconstrucción manual se realizaron utilizando COOT (Emsley et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 60: 2126-32, 2004). La final r_{cristal} y R_{gratis} fueron 23.4 % y 29.7 %, respectivamente, para las 61,706 reflexiones independientes a 2.2Å. Las estadísticas de refinamiento se dan en la Tabla 9.

15

20

25

30

35

Tabla 9.

Refinamiento de la estructura	
Resolución (Å)	73-2,2 (2,234-2,2)
R _{cristal} / R _{gratis} (%) ^{segundo}	23,4/29,7 (27,2/37,7)
n.º de reflexiones	
Conjunto de trabajo	58,570
Conjunto de pruebas (5 % de datos)	3,136
RMSD a partir de valores ideales,	
Longitud del enlace (Å)	0,007
Ángulos de enlace (°)	1,1
Factor B promedio (Å ²)	28,0
Número de átomos de proteína	7,994
Número de disolvente (agua + iones)	864
Gráfico de ramachandran ^c	
Regiones más favorecidas (%)	90,5
Permitido adicional (%)	8,6
Permitido generosamente	0,2
No permitido (%)	0,7
<u>Estructura del complejo IL-17A/Fab6468</u>	

5 La estructura del complejo se determinó a alta resolución (~ 2,2 Å). IL-17A era un homodímero casi simétrico en el cristal y se unía a dos moléculas Fab. Las interacciones anticuerpo-antígeno fueron en gran medida hidrófobas y, en contraste con la mayoría de los anticuerpos, las CDR de cadena ligera formaron una serie de contactos importantes. La estructura molecular global del complejo IL-17A/Fab6468 se muestra en la Figura 6A. El monómero del dímero IL-17A adoptó la topología general de un nudo de cistina (Figura 6B). Los dos monómeros fueron muy similares con un RMSD C α de 0,54 Å para 77 átomos de C α de la columna vertebral. La arquitectura general del nudo de cistina del monómero IL-17A fue muy similar a la de IL-17F con una rmsd de 0,71 Å para 76 átomos de C α (Figura 6B). Cada monómero de IL-17A se estabilizó mediante tres enlaces disulfuro. Para la cadena B, se observaron tres enlaces disulfuro intracatenarios (C¹⁰-C¹⁰⁶, C⁷¹-C¹²¹, C⁷⁶-C¹²³), mientras que para la cadena A la C¹⁰-C¹⁰⁶ no se observó enlace disulfuro debido al desorden en estos segmentos del monómero. Los dos últimos enlaces disulfuro (C⁷¹-C¹²¹, C⁷⁶-C¹²³) estabilizó la arquitectura del nudo de cistina, análoga a IL-17F y NGF. El modelo estructural para la cadena B de IL-17A incluía todos los residuos 10-128 (los residuos 1-9 estaban desordenados), mientras que para los residuos de la cadena A solo se observaron los residuos 21-29, 41-104 y 109-127 y los otros residuos 1 -20, 30-40, 105-108 y 128 faltaban debido a un desorden en la estructura. Para los dos Fab, los residuos 1-2 de ambas cadenas ligeras estaban desordenados o tenían una baja densidad electrónica. Los residuos C-terminales 3 de las cadenas pesada y ligera, incluidos los enlaces disulfuro intercatenarios, así como la etiqueta His en la cadena pesada, se desordenaron.

El segmento N-terminal ordenado de IL-17A (cadena B) contenía un elemento helicoidal corto (residuos 8-12). Se plegó hacia el bucle 3-4 del mismo monómero y formó un enlace disulfuro intracadena (C¹⁰-C¹⁰⁶). En contraste, el segmento equivalente de IL-17F alcanzó el otro monómero del dímero y formó un enlace disulfuro inter-cadena y unió los dos monómeros de manera covalente. Las partes ordenadas de los segmentos 17-39 de los dos monómeros de IL-17A se intercambiaron, como en IL-17F. Este intercambio dio lugar a un cruce de estas partes del dímero IL-17A. Combinado con el enlace disulfuro intramolecular (C¹⁰-C¹⁰⁶), los dos segmentos N-terminales de IL-17A formaron dos monómeros entrelazados, que también dieron lugar a un dímero aparente de 26 kD en SDS-PAGE no reductor.

El dímero de la IL-17A fue casi simétrico para las cuatro cadenas β principales (cadenas 1-4) (Figura 6C). El valor de C α rmsd para 76 residuos es 0.71 Å. La ligera asimetría provino de dos fuentes. Primero, la cadena A contenía una serie de segmentos desordenados, principalmente en el extremo N-terminal. Apparentemente solo se ordenó una cadena β corta (cadena 0, residuos 22-26), mientras que los residuos 10-40 de la cadena B se ordenaron con un segmento helicoidal (residuos 12-16) y una cadena β (cadena 0, residuos 21). -25). Segundo, mientras que la cistina anudó cuatro cadenas β principales de los dos monómeros (40-128) de la IL-17A se relacionaron por una simetría de rotación doble, las partes ordenadas de la cadena 0 no se superponían bien cuando el cuerpo principal se

superpone (no mostrado). No es claro si esto fue un artefacto de replegamiento de proteínas o si existe tal disposición en la naturaleza sin más investigación. La bioactividad de esta especie fue similar a la de una referencia IL-17A de una fuente comercial (también producida en *E. coli*) (R&D Systems, Minneapolis, MN), lo que sugiere que el enlace disulfuro inter o intracatenario para el C¹⁰-DO¹⁰⁶ No es importante por su unión al receptor. Sin embargo, la estructura actual sugiere que los segmentos N-terminales (1-20) y (30-39) son muy flexibles y sus estructuras no afectan la actividad del dímero IL-17A plegado.

El epítipo y paratopo

Los residuos involucrados en la unión entre IL-17A y Fab6468 se enumeran en la Tabla 10. Debido a los residuos faltantes en el protómero A en la IL-17A y la ligera naturaleza asimétrica del dímero de IL-17A, todos los residuos de epítipo de los dos sitios de contacto No fueron idénticos (Tabla 10 y Figura 7). Sin embargo, había un conjunto central de residuos, así como sus interacciones que eran idénticas. Estos residuos fueron L26, R55, E57, P59, E60, R61, Y62, S64, V65, W67, R101, E102, P103 y F110 de IL-17A SEQ ID NO: 105 (resaltados en negro en la Tabla 10), y constituyen El epítipo del núcleo para Fab6468.

Tabla 10. Los residuos del epítipo del núcleo están resaltados en negro. Los residuos núcleo del paratopo están en negrita. Los residuos paratopo extendidos se muestran en paréntesis.

VL	IL-17A epítipo en monómero B	VH	VL	IL-17A epítipo en monómero A	VH
(D25)	F18				
(F93)	P19				
(F93)	V22				
F93	L26		F93	L26	
			(N26)	N27	
			(D29), (F93)	I28	
(D29)	H29		(G28)	N30	
			(D50), (I51), (Y31)	N36	
			(I51), (D52), (D49), (Y31)	R39	
D49	R55	T101, Q99	(Y48), D49	R55	T101, Q99
	E57	L100, Q99, T101		E57	L100, Q99, T101
Y90, F92	P59	Y59, (L100)	Y90, F92	P59	(S52), Y59
F92	E60	Y59, F57, S52, T54	F92	E60	Y59, F57, S52, T54
F92	R61		F92	R61	
F92	Y62		F92, (F93), (D29)	Y62	
Y90	S64		Y90	S64	(L100)
Y31	V65		Y31, (D49)	V65	
D49, (Y31)	W67		D49, (D52), (Y48)	W67	
	L99		(F93)	L99	
F92, Y90	R101	F57, Y59	Y90, F92	R101	F57, Y59
	E102	F57		E102	F57
	P103	F57		P103	F57
	P104			P104	(G56)
F92	F110		F92, (F93)	F110	

De manera similar, los residuos de contacto de los anticuerpos en los dos sitios no fueron todos idénticos. Los residuos involucrados en contactos idénticos a los residuos del epítipo central se conocen como el "paratopo núcleo", que estaba compuesto por los siguientes residuos: Cadena ligera (LC): Y31, D49, Y90, F92, F93 (SEQ ID NO: 79).); y cadena pesada (HC): S52, T54, F57, Y59, Q99, L100 y T101 (SEQ ID NO: 86) (Tabla 10). Los residuos del paratopo central se muestran en negrita en la Tabla 10. Los residuos adicionales del "paratopo extendido" identificados en un monómero que se une a un residuo específico de IL-17A se muestran entre paréntesis.

Los datos de protección H/D para el MORmAb7700 estaban de acuerdo con los estudios de cocrystal, ya que todos los residuos del epítipo central identificados en la estructura de cocrystal, excepto L26, estaban dentro o en los límites de dos de los segmentos protegidos identificados por H/D intercambiar, ⁵⁶NEDPERYPSVIWE⁶⁸ (SEQ ID NO: 157) y ¹⁰⁰RREPPHCPNSFRLEKIL¹¹⁶ (SEQ ID NO: 158) para el MORmAb7700. Se supone que todos los derivados de anticuerpos MORmAb7700, incluidos MORmAb8302 y mAb1926, tienen la misma especificidad de unión que Fab6468 ya que difieren a lo sumo de un residuo en la región N-terminal de VH (ver Ejemplo 1), 3 residuos en la terminal de VL (ver Ejemplo 1) y 3 residuos de CDR (uno en cada uno en H2, H3 y L3, Tabla 1a), ninguno de los cuales forma parte del paratopo del anticuerpo.

La estructura de IL-17A caracterizada en esta descripción es muy similar a la estructura publicada anteriormente, excepto que debido a la falta de segmentos, la cavidad de bolsillo P2 (ver a continuación) no se identificó en el trabajo anterior (estructura 2VXS, disponible en el banco de datos de proteínas <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>; Gerhardt y col., J. Mol. Biol. 394: 905-21, 2009).

La estructura cristalina de la IL-17F humana en complejo con IL-17RA se ha informado (Ely et al., Nat. Inmunología, 10: 1245-51, 2009). Debido a la secuencia y similitudes estructurales entre IL-17A e IL-17F, es probable que la IL-17A interactúe con la IL-17RA de manera similar a la IL-17F. Modelado molecular mediante la superposición de la estructura de IL-17A en el complejo con Fab6468 obtenido en este estudio sobre la IL-17F en el complejo IL-17F/IL-17RA reportado mostró que los segmentos de Fab6468 tendrían enfrentamientos estéricos con IL-17RA. Uno de estos segmentos se localiza alrededor del motivo FF (residuos 92 y 93 de la SEQ ID NO: 79) en la cadena ligera CDR3 de Fab6468. Por lo tanto, no deseando estar limitado por ninguna teoría particular, se sugiere que Fab6468 inhibiría la función de IL-17A al bloquear sus interacciones con IL-17RA y por analogía, IL-17RC, aunque el modo de interacción entre IL-17RC e IL-17A no se conoce a nivel molecular.

Las diferencias significativas en las afinidades de IL-17A e IL-17F para IL-17RA sugieren que puede haber diferencias significativas en los detalles de las interacciones de IL-17A e IL-17RA, cuya extensión solo estará disponible cuando el cocristal se determine la estructura de IL-17A/IL-17RA. Esto está implicado por la identificación de la cavidad de bolsillo P2 en este estudio, que solo se identifica parcialmente en la región análoga de IL-17F en la estructura cristalina de IL-17F/IL-17RA informada (Ely et al., Nat. Inmunología, 10: 1245-51, 2009).

Se identificaron dos bolsas profundas, en gran parte hidrófobas, en la superficie de IL-17A a lo largo de la interfaz del dímero (Figura 8A, 5B). El bolsillo P1, que es análogo a un bolsillo descubierto por primera vez en IL-17F (Hymowitz et al., EMBO J, 20: 5332-41, 2001), está compuesto por los residuos Q94, E95, L97 y K114 del monómero A y L53, Y62, P63, V65, 166, W67, 196, V117 y V119 del monómero B, y viceversa. En un lado del dímero, el bolsillo P1 está parcialmente cubierto por el segmento 30-40, mientras que en el otro lado estaba completamente abierto debido a que el segmento estaba desordenado. Dado que este segmento parece ser flexible, el bolsillo P1 sería accesible por otras moléculas. El bolsillo P2 también está compuesto de residuos de ambas cadenas: V24, L26, 128, Y62, L99, R101, F110 y L112 de monómero A y V22, V24 y L112 de monómero B, y viceversa.

Aunque los detalles de los bolsillos P2 son ligeramente diferentes debido a la asimetría del dímero IL-17A como se describe anteriormente, la geometría general de los dos bolsillos P2 es muy similar. Los dos conjuntos de residuos que recubren las cavidades P1 y P2 están muy bien conservados entre IL-17A e IL-17F (Figura 8C). Sin embargo, en la estructura de IL-17F, el bolsillo P2 está ocupado por los residuos F10 y F11 (F₁₀F₁₁ motivo) (Figura 8B) (Hymowitz et al., EMBO J, 20: 5332-41, 2001). El motivo FF está ausente en la IL-17A humana; en cambio, los residuos de aminoácidos correspondientes son 14 y P5 (residuos 4 y 5 en la SEQ ID NO: 105) (Figura 8C). Es probable que estos residuos no se unan en el bolsillo P2, así como en el motivo FF, ya que son mucho más pequeños que los residuos de fenilalanina, y lo más probable es que no tengan suficiente afinidad por el bolsillo P2. Por lo tanto, el motivo FF de IL-17F es probablemente un discriminante estructural para las interacciones de IL-17A e IL-17F humanas con los receptores IL-17RA e IL-17RC. Es probable que estas dos bolsas en gran parte hidrófobas (P1 y P2) sean necesarias para la unión de IL-17A a IL-17RA. La reciente estructura cristalina del complejo IL-17F/IL-17RA muestra que el motivo FF está desplazado por IL-17RA (Ely et al., Nat. Inmunología 10: 1245-51, 2009). La penalización energética del desalojo de FF de P2 probablemente da como resultado una afinidad de unión más baja. Esto es consistente con las observaciones de que IL-17RA se une a IL-17A con alta afinidad pero a IL-17F con baja afinidad en humanos (Kuestner et al., J Immunol, 179: 5462-73, 2007), y potencialmente podrían explicar las diferencias en las potencias de IL-17A e IL-17F. En ratones, el motivo FF está ausente tanto en IL-17A como en IL-17F, y se reemplaza por los residuos IP y AL, respectivamente. Los pares de residuos AL e IP son pequeños y es probable que tengan una baja afinidad por el bolsillo P2. Por lo tanto, P2 estaría disponible en IL-17A de ratón e IL-17F para la unión de IL-17RA. Tanto el ratón IL-17A como el IL-17F se unen al ratón IL-17RA con afinidad similar (Kuestner et al., J Immunol, 179: 5462-73, 2007), de acuerdo con la presente sugerencia de que la disponibilidad de bolsillo P2 para la unión aumenta la afinidad de los ligandos.

En general, las diferencias estructurales observadas entre IL-17A e IL-17F proporcionan una base para diseccionar sus interacciones con los receptores respectivos. Además, es concebible que los péptidos, los peptidomiméticos y las moléculas pequeñas puedan diseñarse para unirse en una o ambas bolsas para bloquear la interacción de la IL-17A y/o la IL-17F con sus receptores. Dado que el motivo FF presente en Fab6468 (residuos F92 y F93 en la SEQ ID NO: 79) se une a los residuos de bolsa P2 L26, R61, L99, R101 y R102, la estructura Fab 6468 podría usarse para seleccionar y optimizar antagonistas de IL-17A adicionales, como péptidos de bibliotecas de péptidos aleatorias o diseñadas que utilizan la presentación de fagos.

Los residuos que recubren las bolsas P1 y P2 están bien conservados entre la IL-17A y la IL-17F, y el modelo molecular sugiere que un heterodímero IL-17A/F adoptaría una estructura general casi idéntica en comparación con el homodímero IL-17A solo. Por lo tanto, es probable que las bolsas P1 y P2 estén presentes en el heterodímero IL-17A/F con una topología global similar y constituyan sus sitios de unión al receptor. De este modo, los antagonistas de IL-17A que se unen a los residuos de la bolsa P2 podrían unirse y antagonizar el heterodímero IL-17A/F.

Ejemplo 6

Especificidad de unión de especies cruzadas

Para evaluar la especificidad de unión a especies cruzadas de mAbtr1926, se realizó un ELISA de unión con diferentes proteínas IL-17A recubiertas en placas de microtitulación. Las proteínas IL-17A humanas, de ratón y de rata se recubrieron en las placas de microtitulación. Las diluciones en serie del mAb1926 marcado se incubaron a 37 ° C durante 2 horas. Después de la incubación, las placas de microtitulación se lavaron a fondo y se detectó el mAb1926 marcado unido. El mAb 1926 se unió a IL-17A humana mucho más fuerte que a las proteínas IL-17A de rata o ratón (Figura 9). Esta unión reducida a la IL-17A de rata y ratón es consistente con estas proteínas que difieren de la IL-17A humana en 7 posiciones del epítipo extendido Fab6468 (Tabla 10). Además, hay una inserción de un aminoácido en IL-17A de rata y ratón entre los residuos 40 y 41 de IL-17A humana, una posición cercana a parte del epítipo Fab 6468.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que comprende unA VH y unA VL, en en el que el anticuerpo comprende:

- 5
 i. Secuencia de aminoácidos HCDR1 SYAMS;
 ii. Secuencia de aminoácidos HCDR2 TISLTSGFTYYADSVKG;
 iii. Secuencia de aminoácidos HCDR3 QLTLDV;
 10 iv. Secuencia de aminoácidos LCDR1 SGNLGDKYAN;
 v. secuencia de aminoácidos LCDR2 DDIDRPS; y
 vi. Secuencia de aminoácidos LCDR3 GSYDFFLGMIV.

2. El anticuerpo aislado o fragmento de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende:

- 15 i. Secuencia de aminoácidos de VH

QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISLTSGFTYYA
 DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLTLDVWGQGLVTVSS;

- 20 y
 ii. Secuencia de aminoácidos de VL

QSVLTQPPSVSVAPGQTARISCSGDNLGDKYANWYQQKPGQAPVPLVIYDDIDRPSGIPERF
 SGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCGSYDFFLGMIVFGGGTKLTVL.

3. El anticuerpo aislado o fragmento de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo es completamente humano.

25 4. El anticuerpo aislado o fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo está conjugado con polietilenglicol.

5. El anticuerpo o fragmento aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que tiene un isotipo IgG1 o IgG4.

30 6. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo aislado o el fragmento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. Un polinucleótido aislado que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

35 8. Un vector que comprende al menos un polinucleótido de la reivindicación 7.

9. Una célula huésped que comprende (i) el vector de la reivindicación 8, o (ii) un polinucleótido que codifica el VH mencionado en la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y el polinucleótido que codifica el VL descrito en la
 40 reivindicación 1 o la reivindicación 2.

10. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o la composición farmacéutica de la reivindicación 6, para su uso en terapia.

45 11 El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o la composición farmacéutica de la reivindicación 6, para sy uso en un procedimiento para tratar una afección inflamatoria, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo aislado a un paciente que lo necesite durante un tiempo suficiente. para tratar la afección inflamatoria, en donde opcionalmente

50 (a) la afección inflamatoria afecta al tracto respiratorio, el pulmón, el tracto gastrointestinal, el intestino delgado, el intestino grueso, el colon, el recto, la articulación, el tejido óseo y sinovial, el cartílago, el epitelio, el endotelio, el tejido hepático o la piel; o

55 (b) la afección inflamatoria es una afección inflamatoria pulmonar, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), una enfermedad inflamatoria intestinal, una enfermedad autoinmune, artritis reumatoide, psoriasis o esclerosis sistémica.

60

Figura 1.

Figura 1A.

Familia 2 HCDR2

N.º MCR	N.º mAb	Familia 2 HCDR2 consenso													SEQ ID NO				
		H	I	I	P	W	F	G	W	T	Y	A	Q	K	F	Q	G		
7702									T		F								
7701		M									S								
7708	624	R									S								
8297		R						T			S								
8298		R						Y			S								
7785	3077	S									N								
8104	7024	S						T			N								
8105		S						Y			N								
7786		Y									N								
Consenso		HMRSY																	
Fórmula I		Xaa ₁	I	I	P	W	F	G	Xaa ₂	T	Xaa ₃	Y	A	Q	K	F	Q	G	35

Xaa₁ puede ser His, Met, Arg, Ser o Tyr;

Xaa₂ puede ser Trp, Thr or Tyr; y

Xaa₃ puede ser Tyr, Phe, Ser o Asp.

Figura 1.

Figura 1B.

Familia 6a LCDR3

N.º MCR	N.º mAb	Familia 6a LCDR3 consenso										SEQ ID NO
Clon 10		H	Q	F	T	I	P	S	H			
Clon 11		Q			V	T			F			
Clon 12		Q		G	N	Y	R	P	L			
Consenso		HQ		FG	TVN	ITY	PR	SP	HFL			
Fórmula II		Xaa ₄	Q	Xaa ₅	Xaa ₆	Xaa ₇	Xaa ₈	Xaa ₉	Xaa ₁₀			11

Xaa4 puede ser His o Gln;

Xaa5 puede ser Phe o Gly;

Xaa6 puede ser Thr, Val o Asn;

Xaa7 puede ser Ile, Thr o Tyr;

Xaa8 puede ser Pro o Arg;

Xaa9 puede ser Ser o Pro; y

Xaa10 puede ser His, Phe o Leu.

Figura 1.

Figura 1C.

Familia 6b LCDR3

N.º MCR	N.º mAb	Familia 6B LCDR3 consenso													SEC ID N.º
Clon	13	Q	Q	S	N	H	I	P	P	A	T				
7706	4538			Y	R	S	T	L	S	L					
8299	3584			Y	R	S	T	L	S	L					
8300				Y	R	S	T	L	S	L					
8301				Y	R	S	T	L	S	L					
Clon 15				Y	V	S	L	S	F	D					
Clon 16				Y	Y	S	A	L	L	L					
7775	732	T		Y	Y	S	S		S	L					
8101		T		Y	Y	S	S		S	L					
8102		T		Y	Y	S	S		S	L					
8103	4168	T		Y	Y	S	S		S	L					
Consenso		QT	Q	SY	NRVY	HS	ITLAS	PLS	PSFL	ALD	T				
Fórmula III		Xaa11	Q	Xaa12	Xaa13	Xaa14	Xaa15	Xaa16	Xaa17	Xaa18	T				17

Xaa11 puede ser Gln o Thr;
 Xaa12 puede ser Ser or Tyr;
 Xaa13 puede ser Asn, Arg, Val or Tyr;
 Xaa14 puede ser His o Ser;
 Xaa15 puede ser Ile, Thr, Leu, Ala or Ser;
 Xaa16 puede ser Pro, Leu or Ser;
 Xaa17 puede ser Pro, Ser, Phe or Leu; y
 Xaa18 puede ser Ala, Leu o Asp.

Figura 1.

Figura 1D.

Familia 6b HCDR3

MOR#	mAb#	Familia 6b HCDR3 consenso										SEQ ID NO		
Clon 13		E	V	D	S	M	Y	Y	S	Y	F	D	I	
7706	4538													
8299	3584													
8300						I								
8301						L								
Clon 15						T								
Clon 16														
7775	732													
8101						I								
8102						L								
8103	4168					T								
Consenso		E	V	D	S	MILT	Y	Y	S	Y	F	D	I	
Fórmula IV		E	V	D	S	Xaa19	Y	Y	S	Y	F	D	I	57

Xaa19 es Met, Ile, Leu o Thr.

Figura 1.

Figura 1E.

Familia 19a LCDR3

Clon	N.º MOR	N.º rAb	Familia 19a secuencia consenso LCDR3											SEQ ID NO
179	Clon 179		G	S	Y	D	F	F	L	G	M	I	V	
180	Clon 180													
181	7709													
182	Clon 182													
183	7700	1926												
	8095													
	8096													
	8097													
	8098													
	8141										L			
	8142										T			
	8143										Y			
	8160	7146									L			
	8161										T			
	8162										Y			
ut	8302	6785												
T	8303										T			
L		5548									L			
184	7768													
185	Clon 185													
Consenso			G	S	Y	D	F	F	L	G	MLTY	I	V	
Fórmula V			G	S	Y	D	F	F	L	G	Xaa20	I	V	22

Xaa20 es Met, Leu, Thr o Tyr.

Figura 1.

Figura 1F.

Familia 19a HCDR2

Fórmula VI

N.º MOR	N.º mAb	Familia 19a secuencia consenso HCDR2													SEQ ID				
Clon 179		A	I	N	G	L	G	T	H	K	Y	Y	A	D	S	V	K	G	
Clon 180				S	M	D		G	W	T									
7709		G			K	A		Y	Y	T									
Clon 182		G		S		H		G	Y		F								
7700	1926	T		S	M	T	S	G	F	T									
8095		T		S	I	T	S	G	F	T									
8096		T		S	L	T	S	G	F	T									
8097		T		S	M	T	S	G	F	T									
8098		T		S	M	T	S	G	F	T									
8141		T		S	M	T	S	G	F	T									
8142		T		S	M	T	S	G	F	T									
8143		T		S	M	T	S	G	F	T									
8160	7146	T		S	M	T	S	G	F	T									
8161		T		S	M	T	S	G	F	T									
8162		T		S	M	T	S	G	F	T									
8302	6785	T		S	L	T	S	G	F	T									
8303		T		S	L	T	S	G	F	T									
	5548	T		S	L	T	S	G	F	T									
7768		V			K	G		D	F										
Clon 185		V		S	H	S		G	W	I	N								
Consenso		AGTV	I	NS	GMKILH	LDAHTGS	GS	TGYD	HWYF	KTI	YFN	Y	A	D	S	V	K	G	
Fórmula VI		Xaa21	I	Xaa22	Xaa23	Xaa24	Xaa25	Xaa26	Xaa27	Xaa28	Xaa29	Y	A	D	S	V	K	G	46

Xaa21 puede ser Ala, Gly, Thr o Val;
 Xaa22 puede ser Asn or Ser;
 Xaa23 puede ser Gly, Met, Lys, Ile, Leu o His;
 Xaa24 puede ser Leu, Asp, Ala, His, Thr, Gly o Ser;
 Xaa25 puede ser Gly or Ser;
 Xaa26 puede ser Thr, Gly, Tyr o Asp;
 Xaa27 puede ser His, Trp, Tyr o Phe;
 Xaa28 puede ser Lys, Thr or Ile; y
 Xaa29 puede ser Tyr, Phe o Asn.

Figura 1G.

Figura 1.

Familia 19a HCDR3

n.º MOR	n.º mAb	Familia 19a secuencia consenso HCDR3						SEQ ID NO
		Q	L	M	L	D	V	
Clon 179		Q	L	M	L	D	V	
Clon 180								
7709								
Clon 182								
7700	1926							
8095								
8096								
8097				L				
8098				T				
8141								
8142								
8143								
8160	7146			T				
8161				T				
8162				T				
8302	6785			T				
8303				T				
	5548			T				
7768								
Clon 185								
Consenso		Q	L	MLT	L	D	V	
Fórmula VII		Q	L	Xaa30	L	D	V	61

Xaa30 puede ser Met, Leu o Thr.

Figura 1H.

Figura 1.

Familia 9b HCDR2

n.º MOR	n.º mAb	Familia 19b secuencia consenso HCDR2													SEQ ID NO			
Clone 186		V	T	S	A	N	G	R	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	
Clone 187					K	M		H										
Clone 188					M	T		N										
Clone 189					H	R	D	N					G					
Consensus		V	T	S	AKMH	NMTR	GD	RHN	T	Y	Y	A	DG	S	V	K	G	
Fórmula VIII		V	T	S	Xaa31	Xaa32	Xaa3	Xaa34	T	Y	Y	A	Xaa35	S	V	K	G	51

Xaa31 puede ser Ala, Lys, Met o His;
 Xaa32 puede ser Asn, Met, Thr o Arg;
 Xaa33 puede ser Gly o Asp;
 Xaa34 puede ser Arg, His o Asn; and
 Xaa35 puede ser Asp o Gly.

Figura 2.

Figura 2A.

```

6785      1                               *                               *                               60
          QSVLTQPPSVSVAPGQTARITCSGDNLGDKYANWYQQKPGQAPVLVIYDDIDRPSGIPER

IGLV3-1  SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPER
IGLV3-9  SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDSNRPSGIPER
IGLV3-10 SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSGQAPVLVIYEDSKRPSGIPER
IGLV3-12 SYELTQPHSVSVATAQMARITCGGNNIGSKAVHWYQQKPGQDPVLVIYSDSNRPSGIPER
IGLV3-16 SYELTQPPSVSVSLGQMARITCSGEALPKKYAYWYQQKPGQFPVLVIYKDSERPSGIPER
IGLV3-19 SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDLSRYYASWYQQKPGQAPVLVIYKNNRPSGIPDR
IGLV3-21 SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVIYDSDRPSGIPER
IGLV3-22 SYELTQLPSVSVSPGQTARITCSGDVLDGENYADWYQQKPGQAPVLVIYEDSERYPGIPER
IGLV3-25 SYELMQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKQYAYWYQQKPGQAPVLVIYKDSERPSGIPER
IGLV3-27 SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDVLAKKYARWFQKPGQAPVLVIYKDSERPSGIPER
IGLV3-32 SSGPTQVPAVSVALGQMARITCQGDSEMGSEYEHWYQQKPGQAPVLVIYDSSDRPSRIPER

          61                               * * *                               108
6785      FSGSNSGNTATLTIISGTQAEDEADYYCGSYDFFLGMIVFGGGTKLTVL

IGLV3-1  FSGSNSGNTATLTIISGTQAMDEADYYCQAWDSSTA
IGLV3-9  FSGSNSGNTATLTIISRAQAGDEADYYCQVWDSSTA
IGLV3-10 FSGSSSGTMTLTIISGAQVEDEADYYCYSTDSSGNH
IGLV3-12 FSGSNPGNTTTLTISRIEAGDEADYYCQVWDSSTDH
IGLV3-16 FSGSSSGTIVTLTISGVQAEDEADYYCLSADSSGTY
IGLV3-19 FSGSSSGNTASLTIITGAQAEDEADYYCNSRDSGNH
IGLV3-21 FSGSNSGNTATLTIISRV EAGDEADYYCQVWDSSTDH
IGLV3-22 FSGSTSGNTTTLTISRVLTEDEADYYCLSGDEDN
IGLV3-25 FSGSSSGTTVTLTISGVQAEDEADYYCQSADSSGTY
IGLV3-27 FSGSSSGTTVTLTISGAQVEDEADYYCYSAADNN
IGLV3-32 FSGSKSGNTTTLTITGAQAEDEADYYQLIDNHA

IGLJ1    YVFGTGTKVTVL
IGLJ2    VVFGGGTKLTVL
IGLJ3    VVFGGGTKLTVL
IGLJ4    FVFGGGTQLIIL
IGLJ5    WVFGGTELTVL
IGLJ6    NVFGSGTKVTVL
IGLJ7    AVFGGGTQLTVL
    
```

Figura 2.

Figura 2B.

```

1                               * * * * *                               70
6785   QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISLTSGFTYYADSVKGRFTI

IGHV3-7   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI
IGHV3-9   EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIKYADSVKGRFTI
IGHV3-11  QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI
IGHV3-16  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSNDMNWARDKAPGKGLEWVSGVSWNGSRTHYVDSVKRRFII
IGHV3-19  TVQLVESGGGLVPEPGGSLRLSCAASGFTFNSNDMNWRQAPGKGLEWVSGVSWNGSRTHYADSVKGRFII
IGHV3-20  EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKGRFTI
IGHV3-21  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTI
IGHV3-23  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTI
IGHV3-30  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI
IGHV3-30-3 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI
IGHV3-33  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSNKYYADSVKGRFTI
IGHV3-35  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSNDMNVHQAAPGKGLEWVSGVSWNGSRTHYADSVKGRFII
IGHV3-43  EVQLVESGGVVVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYTMHWVRQAPGKGLEWVSLISWDGGSTYYADSVKGRFTI
IGHV3-48  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTI
IGHV3-64  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEVSAISSNGGSTYYANSVKGRFTI
IGHV3-74  EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRINSDGSSTSYADSVKGRFTI

71                               ***                               115
6785   SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLTLDVWGQGTLVTVSS
IGHV3-7   SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-9   SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKD
IGHV3-11  SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-16  SRDNSRNSLYLQKNRRRAEDMAVYYCVR
IGHV3-19  SRDNSRNFLYQQMNSLRPEDMAVYYCVR
IGHV3-20  SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYHCAR
IGHV3-21  SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-23  SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
IGHV3-30  SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-30-3 SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-33  SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-35  SRDNSRNTLYLQTNSLRAEDTAVYYCVR
IGHV3-35  SRDNSRNTLYLQTNSLRAEDTAVYYCVR
IGHV3-43  SRDNSKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKD
IGHV3-48  SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
IGHV3-64  SRDNSKNTLYLQMGSLRAEDMAVYYCAR
IGHV3-74  SRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

IGHJ1   ...AEYFQHWGQGTLVTVSS
IGHJ2   ...YWFDLWGRGTLVTVSS
IGHJ3   .....AFDVWQGQTMVTVSS
IGHJ4   .....YFDYWGQGTLVTVSS
IGHJ5   ....NWFDSWGQGTLVTVSS
IGHJ6   YYYYYGMDVWGQGTVTVSS
    
```

Figura 3

Figura 3A.

MORmAb 8141	MORmAb 8142	MORmAb 8143	mAb 6785	Numeración			Kabat	Chothia
VL	VL	VL	VL	Secuencial	Kabat	Chothia	CDR	HV
Q	Q	Q	Q	1	1	1		
S	S	S	S	2	2	2		
V	V	V	V	3	3	3		
L	L	L	L	4	4	4		
T	T	T	T	5	5	5		
Q	Q	Q	Q	6	6	6		
P	P	P	P	7	7	7		
P	P	P	P	8	8	8		
S	S	S	S	9	9	9		
V	V	V	V	10	11	11		
S	S	S	S	11	12	12		
V	V	V	V	12	13	13		
A	A	A	A	13	14	14		
P	P	P	P	14	15	15		
G	G	G	G	15	16	16		
Q	Q	Q	Q	16	17	17		
T	T	T	T	17	18	18		
A	A	A	A	18	19	19		
R	R	R	R	19	20	20		
I	I	I	I	20	21	21		
S	S	S	S	21	22	22		
C	C	C	C	22	23	23		
S	S	S	S	23	24	24		
G	G	G	G	24	25	25		
D	D	D	D	25	26	26		
N	N	N	N	26	27	27		
L	L	L	L	27	28	28		
G	G	G	G	28	29	29		
D	D	D	D	29	30	30		
K	K	K	K	30	31	31		
Y	Y	Y	Y	31	32	32		
A	A	A	A	32	33	33		
N	N	N	N	33	34	34		
W	W	W	W	34	35	35		
Y	Y	Y	Y	35	36	36		
Q	Q	Q	Q	36	37	37		
Q	Q	Q	Q	37	38	38		
K	K	K	K	38	39	39		
P	P	P	P	39	40	40		
G	G	G	G	40	41	41		
Q	Q	Q	Q	41	42	42		
A	A	A	A	42	43	43		
P	P	P	P	43	44	44		
V	V	V	V	44	45	45		
L	L	L	L	45	46	46		
V	V	V	V	46	47	47		
I	I	I	I	47	48	48		
Y	Y	Y	Y	48	49	49		
D	D	D	D	49	50	50		
D	D	D	D	50	51	51		
I	I	I	I	51	52	52		
D	D	D	D	52	53	53		
R	R	R	R	53	54	54		
P	P	P	P	54	55	55		
S	S	S	S	55	56	56		
G	G	G	G	56	57	57		

ES 2 728 115 T3

I	I	I	I	57	58	58		
P	P	P	P	58	59	59		
E	E	E	E	59	60	60		
R	R	R	R	60	61	61		
F	F	F	F	61	62	62		
S	S	S	S	62	63	63		
G	G	G	G	63	64	64		
S	S	S	S	64	65	65		
N	N	N	N	65	66	66		
S	S	S	S	66	67	67		
G	G	G	G	67	68	68		
N	N	N	N	68	69	69		
T	T	T	T	69	70	70		
A	A	A	A	70	71	71		
T	T	T	T	71	72	72		
L	L	L	L	72	73	73		
T	T	T	T	73	74	74		
I	I	I	I	74	75	75		
S	S	S	S	75	76	76		
G	G	G	G	76	77	77		
T	T	T	T	77	78	78		
Q	Q	Q	Q	78	79	79		
A	A	A	A	79	80	80		
E	E	E	E	80	81	81		
D	D	D	D	81	82	82		
E	E	E	E	82	83	83		
A	A	A	A	83	84	84		
D	D	D	D	84	85	85		
Y	Y	Y	Y	85	86	86		
Y	Y	Y	Y	86	87	87		
C	C	C	C	87	88	88		
G	G	G	G	88	89	89		
S	S	S	S	89	90	90		
Y	Y	Y	Y	90	91	91		
D	D	D	D	91	92	92		
F	F	F	F	92	93	93		
F	F	F	F	93	94	94		
L	L	L	L	94	95	95		
G	G	G	G	95	a	a		
L	T	Y	M	96	b	b		
I	I	I	I	97	96	96		
V	V	V	V	98	97	97		
F	F	F	F	99	98	98		
G	G	G	G	100	99	99		
G	G	G	G	101	100	100		
G	G	G	G	102	101	101		
T	T	T	T	103	102	102		
K	K	K	K	104	103	103		
L	L	L	L	105	104	104		
T	T	T	T	106	105	105		
V	V	V	V	107	106	106		
L	L	L	L	108	a	a		

Figura 3.

Figura 3B.

MORmAb 7709	MORmAB 7700	MORmAb 8096	mAb 6785	Numeración			Kabat CDR	Chothia HV
				Secuencial	Kabat	Chothia		
VH	VH	VH	VH					
Q	Q	Q	Q	1	1	1		
V	V	V	V	2	2	2		
Q	Q	Q	Q	3	3	3		
L	L	L	L	4	4	4		
L	L	L	L	5	5	5		
E	E	E	E	6	6	6		
S	S	S	S	7	7	7		
G	G	G	G	8	8	8		
G	G	G	G	9	9	9		
G	G	G	G	10	10	10		
L	L	L	L	11	11	11		
V	V	V	V	12	12	12		
Q	Q	Q	Q	13	13	13		
P	P	P	P	14	14	14		
G	G	G	G	15	15	15		
G	G	G	G	16	16	16		
S	S	S	S	17	17	17		
L	L	L	L	18	18	18		
R	R	R	R	19	19	19		
L	L	L	L	20	20	20		
S	S	S	S	21	21	21		
C	C	C	C	22	22	22		
A	A	A	A	23	23	23		
A	A	A	A	24	24	24		
S	S	S	S	25	25	25		
G	G	G	G	26	26	26		
F	F	F	F	27	27	27		
T	T	T	T	28	28	28		
F	F	F	F	29	29	29		
S	S	S	S	30	30	30		
S	S	S	S	31	31	31		
Y	Y	Y	Y	32	32	32		
A	A	A	A	33	33	33		
M	M	M	M	34	34	34		
S	S	S	S	35	35	35		
W	W	W	W	36	36	a		
V	V	V	V	37	37	36		
R	R	R	R	38	38	37		
Q	Q	Q	Q	39	39	38		
A	A	A	A	40	40	39		
P	P	P	P	41	41	40		
G	G	G	G	42	42	41		
K	K	K	K	43	43	42		
G	G	G	G	44	44	43		
L	L	L	L	45	45	44		
E	E	E	E	46	46	45		
W	W	W	W	47	47	46		
V	V	V	V	48	48	47		
S	S	S	S	49	49	48		
G	T	T	T	50	50	49		
I	I	I	I	51	51	50		
N	S	S	S	52	52	51		
K	M	L	L	53	a	52		
A	T	T	T	54	53	53		
G	S	S	S	55	54	54		
Y	G	G	G	56	55	55		
Y	F	F	F	57	56	56		
T	T	T	T	58	57	57		

ES 2 728 115 T3

Y	Y	Y	Y	59	58	58		
Y	Y	Y	Y	60	59	59		
A	A	A	A	61	60	60		
D	D	D	D	62	61	61		
S	S	S	S	63	62	62		
V	V	V	V	64	63	63		
K	K	K	K	65	64	64		
G	G	G	G	66	65	65		
R	R	R	R	67	66	66		
F	F	F	F	68	67	67		
T	T	T	T	69	68	68		
I	I	I	I	70	69	69		
S	S	S	S	71	70	70		
R	R	R	R	72	71	71		
D	D	D	D	73	72	72		
N	N	N	N	74	73	73		
S	S	S	S	75	74	74		
K	K	K	K	76	75	75		
N	N	N	N	77	76	76		
T	T	T	T	78	77	77		
L	L	L	L	79	78	78		
Y	Y	Y	Y	80	79	79		
L	L	L	L	81	80	80		
Q	Q	Q	Q	82	81	81		
M	M	M	M	83	82	82		
N	N	N	N	84	a	a		
S	S	S	S	85	b	b		
L	L	L	L	86	c	c		
R	R	R	R	87	83	83		
A	A	A	A	88	84	84		
E	E	E	E	89	85	85		
D	D	D	D	90	86	86		
T	T	T	T	91	87	87		
A	A	A	A	92	88	88		
V	V	V	V	93	89	89		
Y	Y	Y	Y	94	90	90		
Y	Y	Y	Y	95	91	91		
C	C	C	C	96	92	92		
A	A	A	A	97	93	93		
R	R	R	R	98	94	94		
Q	Q	Q	Q	99	95	95		
L	L	L	L	100	96	96		
M	M	M	T	101	97	97		
L	L	L	L	102	98	98		
D	D	D	D	103	101	101		
V	V	V	V	104	102	102		
W	W	W	W	105	103	103		
G	G	G	G	106	104	104		
Q	Q	Q	Q	107	105	105		
G	G	G	G	108	106	106		
T	T	T	T	109	107	107		
L	L	L	L	110	108	108		
V	V	V	V	111	109	109		
T	T	T	T	112	110	110		
V	V	V	V	113	111	111		
S	S	S	S	114	112	112		
S	S	S	S	115	113	113		

Figura 4.

Figura 4A.

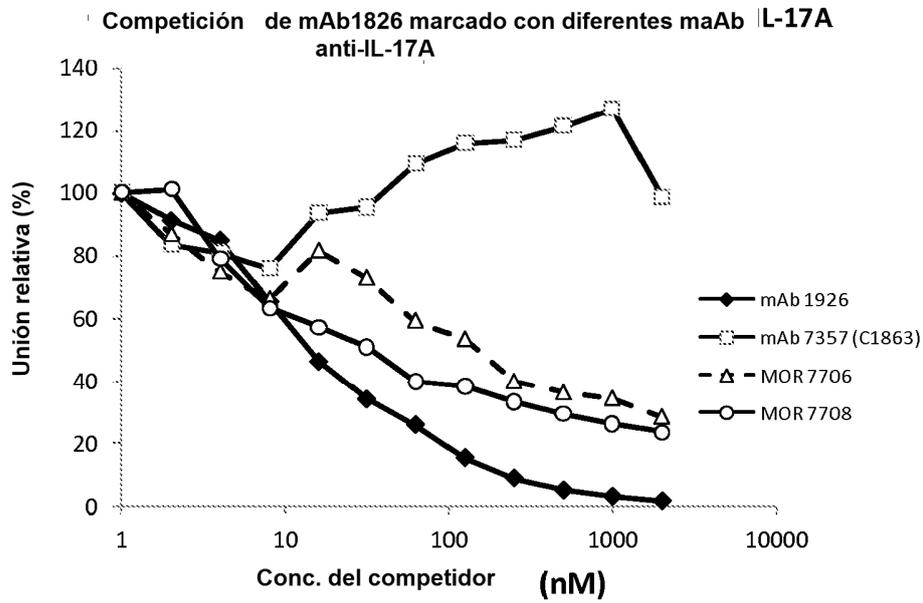


Figura 4B.

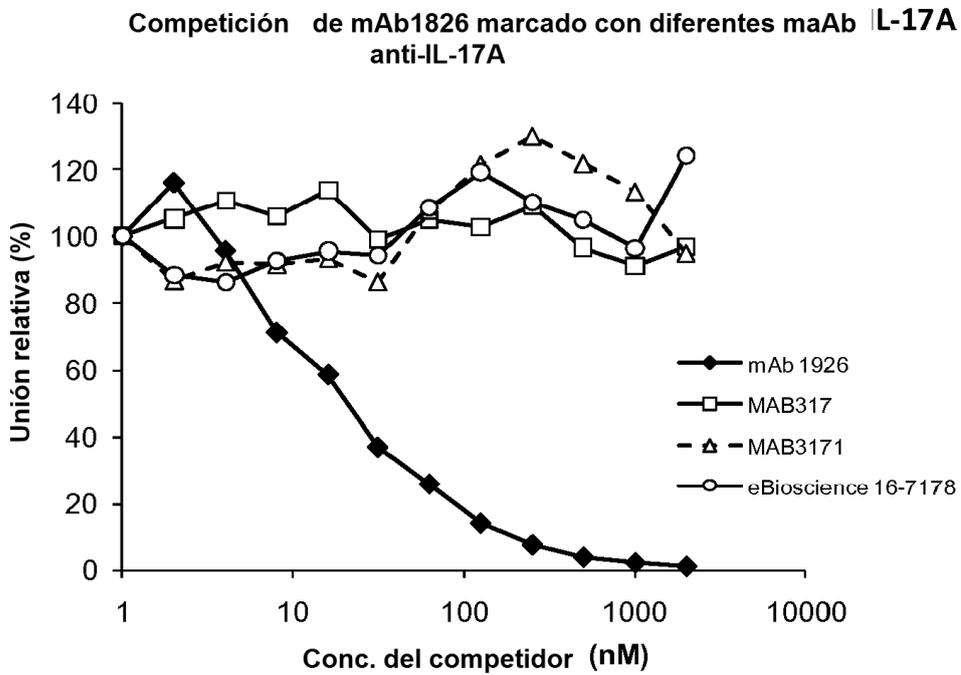


Figura 4.

Figura 4C.

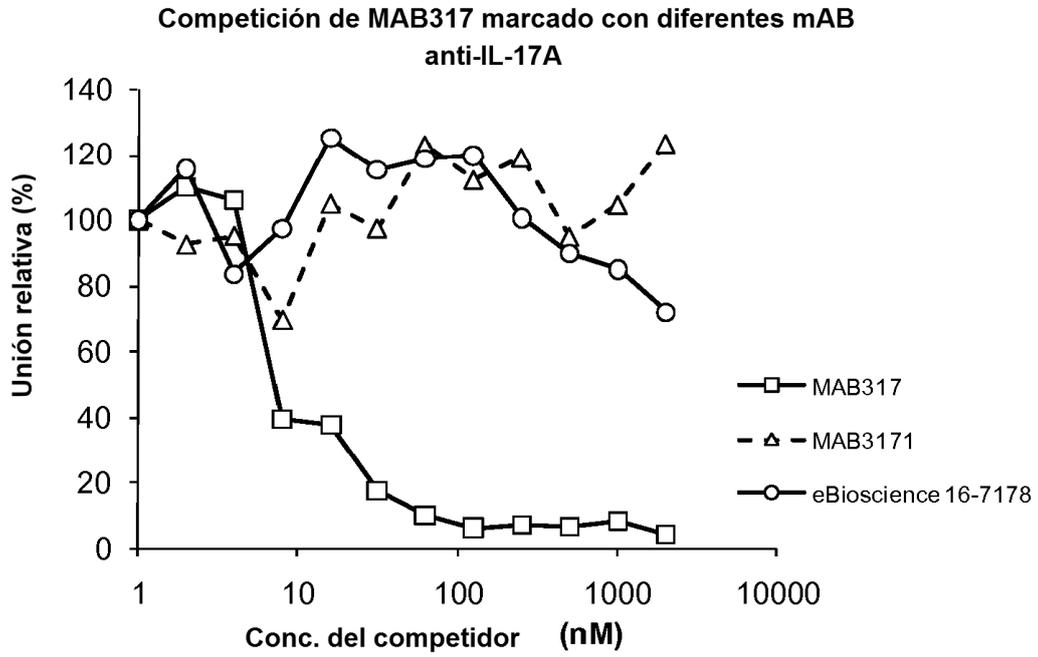


Figura 4D.

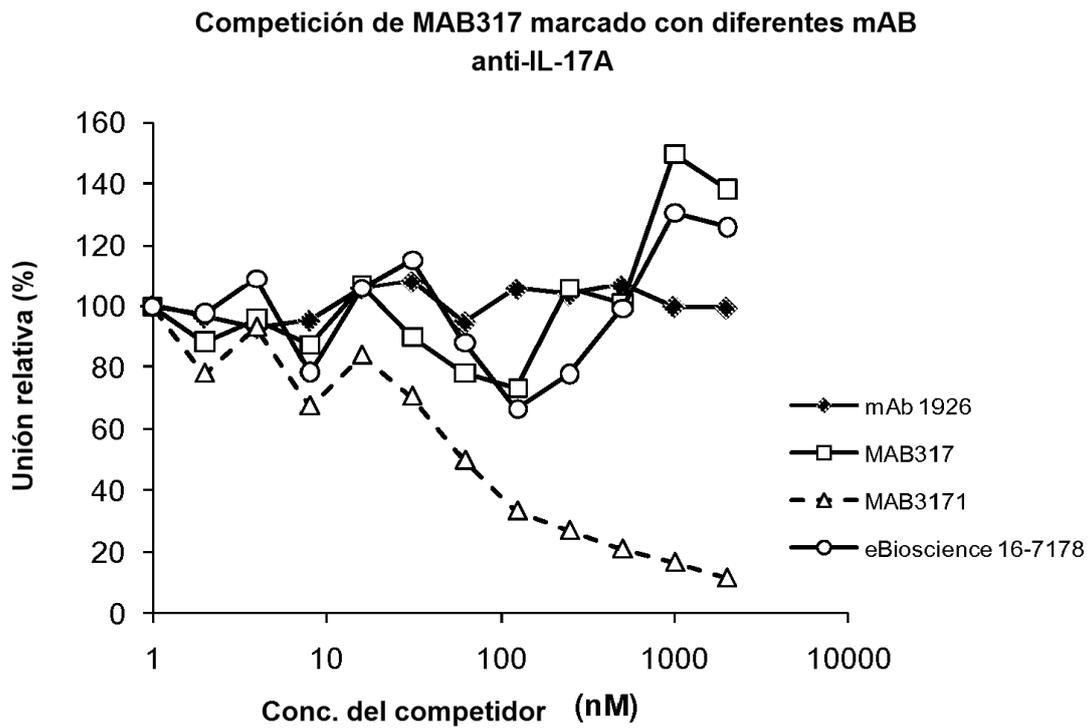


Figura 4.

Figura 4E.

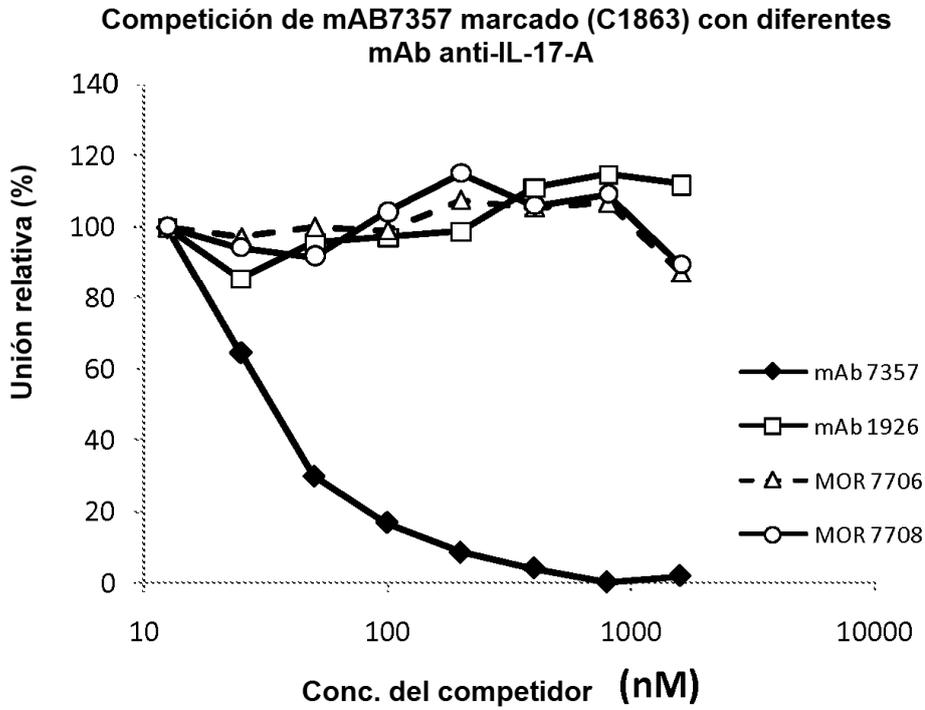


Figura 4F.

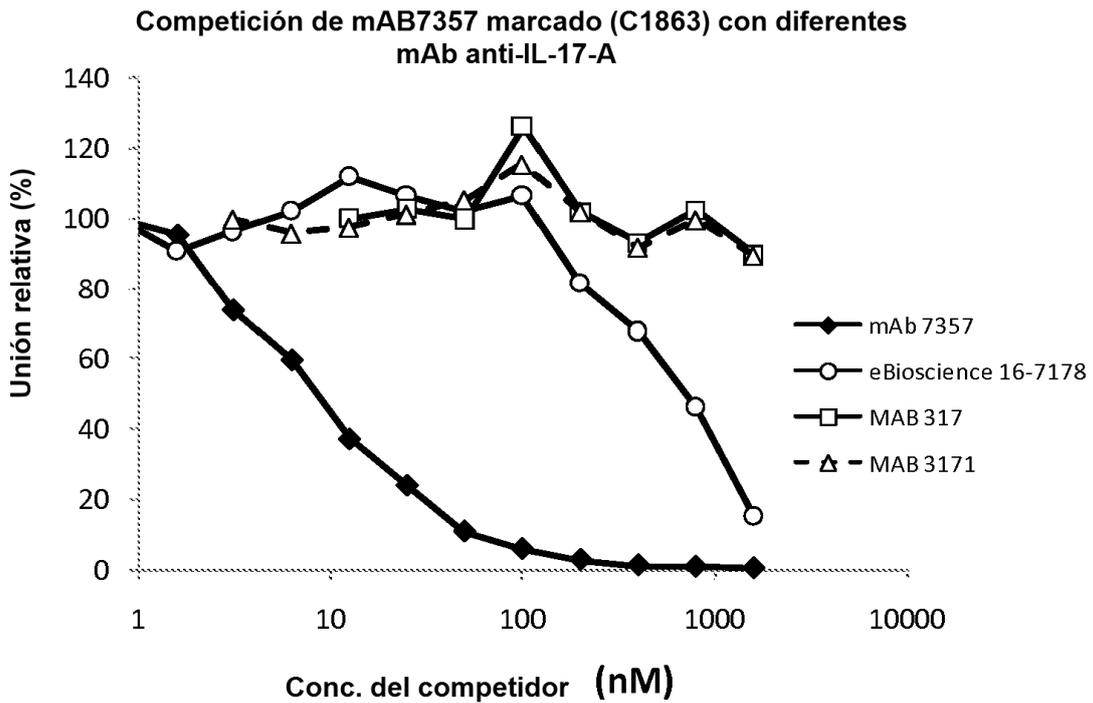
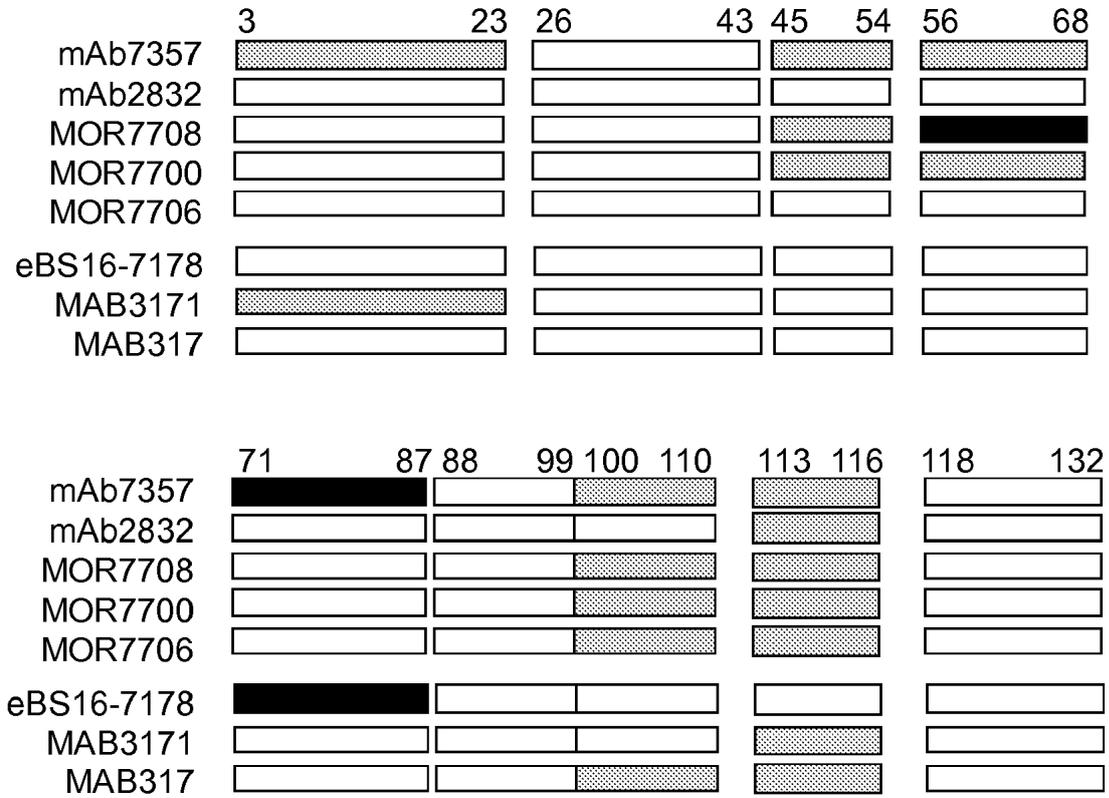


Figura 5



 Intercambio H/D fuertemente protegido por anticuerpo
 Intercambio H/D débilmente protegido por anticuerpo
 no protegido

Figura 6

Figura 6A

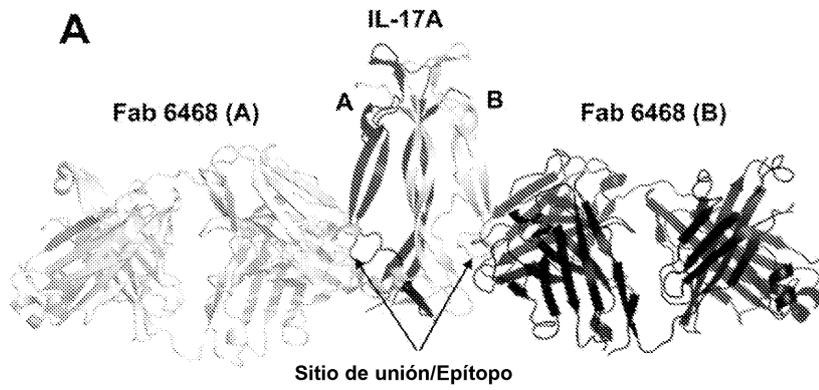


Figura 6B.



Figura 6C.



Figura 6D.



Figura 7

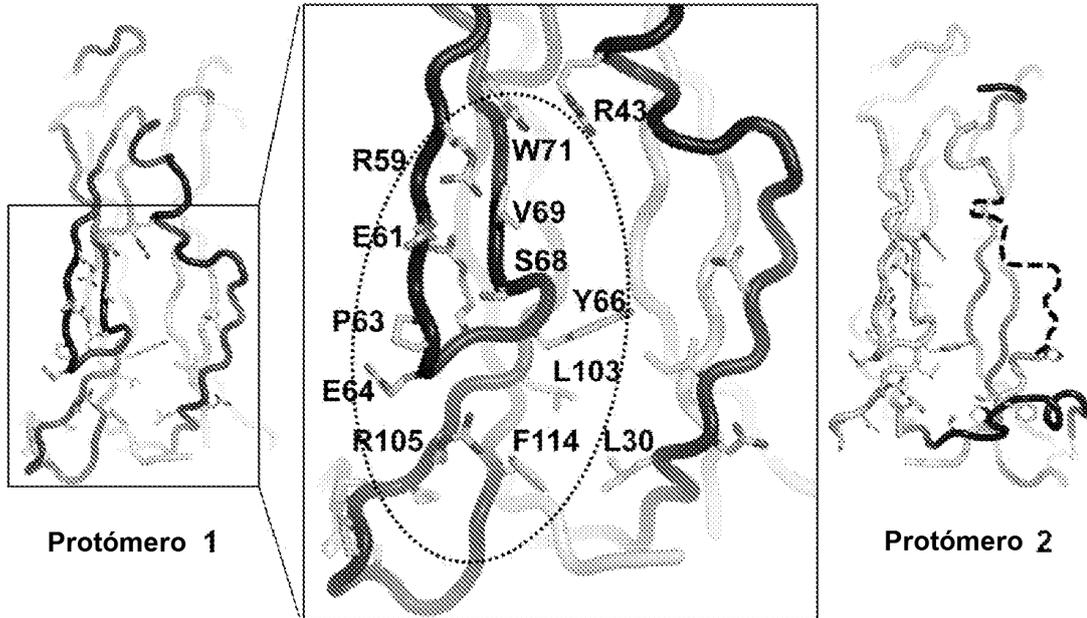


Figura 8.

Figura 8A.

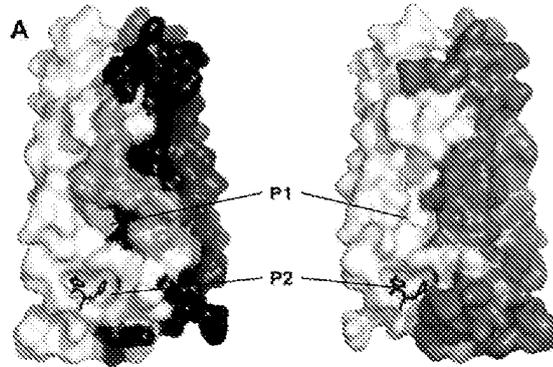


Figura 8B.

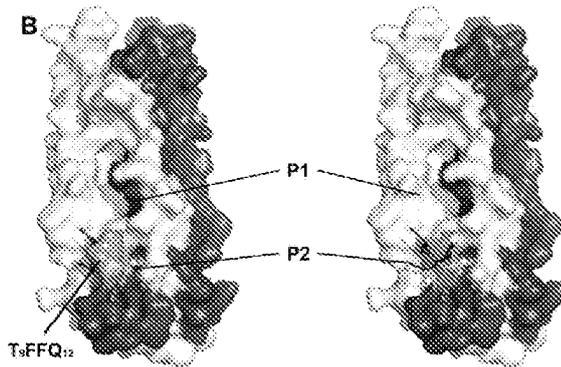


Figura 8C.

C

◆◆ Restos del bolsillo P1

Restos del bolsillo P2

▲▲ Los símbolos completos y rellenos indican restos de los dos monómeros del dímero IL-17A

IL-17A (1) --IVRAGITIPRNP-GCPNSEDKNFFRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSD
 IL-17F (1) RKIPKVGHTFFQKPESCPPVPGG-----SMKLDIGIINENQRVMSRN

IL-17A (48) YNRSTSPWNLHRNEDPERYP SVIWEAQCRHLGCINADGNVDYHMNSVPI
 IL-17F (45) ESRSTSPWNYT VTWDPENRYPSEVVQAQCRNLGCINAQGGKEDISMNSVPI

IL-17A (98) QEILVRRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPVHHVQ
 IL-17F (95) QETLVVRRKHQGC SVSFQLEKVLVTVGCTCVTPVHHVQ

▲ ▲ ▲ ▲ ▲ ▲

Figura 9

Unión de mAb 1926 a diferentes especies de IL-17A

