

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 473**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2014 PCT/IB2014/058854**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014 WO14122613**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2014 E 14708950 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 2953969**

54 Título: **Anticuerpos anti-IL-17A y su uso en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios e inflamatorios**

30 Prioridad:

08.02.2013 US 201361762406 P

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

05.05.2020

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**DI PADOVA, FRANCO, E.;
HUBER, THOMAS y
RONDEAU, JEAN-MICHEL, RENE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 758 473 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

Anticuerpos anti-IL-17A y su uso en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios e inflamatorios

5 Solicitudes relacionadas

La presente divulgación reivindica prioridad del documento US 61/762406, presentado el 8 de febrero de 2013.

10 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a anticuerpos terapéuticos y partes de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a IL-17A y IL-17AF heterodimérica, pero no se unen específicamente a IL-17F homodimérica. La divulgación se refiere más específicamente a anticuerpos específicos y partes de unión a antígeno de los mismos que inhiben los efectos de IL-17A y pueden inhibir la actividad inducida por IL-17A, así como composiciones y métodos de uso para dichos anticuerpos y partes de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo, para tratar trastornos patológicos que pueden tratarse mediante la inhibición de la señalización de IL-17A, por ejemplo, trastornos autoinmunitarios e inflamatorios tales como artritis reumatoide, psoriasis, lupus eritematoso diseminado (LED), nefritis lúpica, esclerosis múltiple o enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma o fibrosis quística.

20 Antecedentes de la invención

La interleucina-17A (IL-17A también llamada a veces IL-17) es la linfocina central producida por un subconjunto recién definido de linfocitos T inflamatorios, los linfocitos Th17. En varios modelos animales, estas células son centrales en diversos procesos autoinmunitarios e inflamatorios. Niveles aumentados de IL-17A se han asociado con uveítis (Ambadi-Obi, *et al.* 2007, *Nature Med*; 13:711-718), artritis reumatoide (AR), psoriasis, inflamación de las vías respiratorias, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad inflamatoria del intestino (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), rechazo de aloinjerto, cáncer, abscesos y adhesiones intraperitoneales, y esclerosis múltiple (Weaver, *et al.* 2007, *Annu Rev Immunol*; 25:821-852; Witowski *et al.* 2004, *Cell Mol Life Sci*; 61:567-579). Los linfocitos Th17 pueden iniciar rápidamente una respuesta inflamatoria que está dominada por neutrófilos (Miossec, *et al.* 2009, *NEJM*; 361:888-98).

La IL-17A se identificó originalmente como un transcrito de un híbrido de linfocitos T de roedor. Es el miembro fundamental de un grupo de citocinas llamado familia de IL-17. Conocida como CTLA8 en roedores, IL-17A muestra alta homología con IL-17A vírica codificada por un marco abierto de lectura del radinivirus T-linfotrópico herpesvirus saimiri (Rouvier E, *et al.* 1993, *J. Immunol.* 150: 5445-56).

La IL-17A es una citocina que actúa como mediador potente en las reacciones de tipo retardado aumentando la producción de quimiocinas en diversos tejidos para reclutar monocitos y neutrófilos al sitio de inflamación, similar al interferón gamma. La familia de IL-17 funciona en el papel de citocinas proinflamatorias que responden a la invasión del sistema inmunitario por patógenos extracelulares e induce la destrucción de la matriz celular del patógeno. La IL-17A actúa de forma sinérgica con el factor de necrosis tumoral y la interleucina-1 (Miossec P, *et al.* 2009, *N. Engl. J. Med.* 361:888-98).

Para provocar sus funciones, la IL-17A se une a un receptor de superficie celular de tipo I llamado IL-17R del que hay al menos dos variantes, IL-17RA e IL-17RC (Pappu R, *et al.* 2012, *Trends Immunol.*; 33:343-9). El IL-17RA se une a IL-17A, IL-17AF e IL-17F y se expresa en múltiples tejidos: células del endotelio vascular, linfocitos T periféricos, linajes de linfocitos B, fibroblastos, pulmón, células mielomonocíticas y células del estroma medular (Kolls JK, Lindén A 2004, *Immunity* 21:467-76; Kawaguchi M, *et al.* 2004, *J. Allergy Clin. Immunol.* 114:1265-73; Moseley TA, *et al.* 2003, *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:155-74).

Además de IL-17A, los miembros de la familia de IL-17 incluyen IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (también llamada IL-25) e IL-17F. Todos los miembros de la familia de IL-17 tienen una estructura proteínica similar, con cuatro restos de cisteína muy conservados cruciales para su forma tridimensional. El análisis filogenético revela que entre los miembros de la familia de IL-17, las isoformas de IL-17F 1 y 2 (ML-1) tienen la máxima homología con IL-17A (compartiendo un 55 y 40 % de identidad de aminoácidos con IL-17A, respectivamente), seguidas de IL-17B (29 %), IL-17D (25 %), IL-17C (23 %) e IL-17E que es la más remotamente relacionada con IL-17A (17 %). Estas citocinas están muy bien conservadas en mamíferos, con tanto como un 62-88 % de aminoácidos conservados entre los homólogos humano y de ratón (Kolls JK, Lindén A 2004, *Immunity* 21:467-76).

La IL-17A es una proteína de 155 aminoácidos que es una glucoproteína secretada homodimérica unida por disulfuro con una masa molecular de 35 kDa (Kolls JK, Lindén A 2004, *Immunity* 21:467-76). La estructura de IL-17A consiste en un péptido señal seguido de la región de aminoácidos característica de la familia de IL-17. En primer lugar se identificó un sitio de glucosilación ligado a N en la proteína después de la purificación de la proteína, que reveló dos bandas en análisis de SDS-PAGE convencional, una a 15 kDa y otra a 20 kDa. La comparación de los diferentes miembros de la familia de IL-17 reveló cuatro cisteínas conservadas que forman dos enlaces disulfuro (Yao Z, *et al.*

1995, J. Immunol. 155:5483-6). La IL-17 es única porque no alberga parecido con otras interleucinas conocidas. Además, la IL-17 no alberga parecido con ninguna otra proteína o dominio estructural conocido (Kolls JK, Lindén A 2004, Immunity 21:467-76). En general, otros miembros de la familia de IL-17, tal como IL-17F, forman homodímeros (como IL-17A).

5 También se sabe que la IL-17A forma un heterodímero con IL-17F en determinadas circunstancias. La IL-17AF heterodimérica también se produce por linfocitos Th17 después de estimulación por IL-23.

10 Se cree que la IL-17AF emite señalización a través de los receptores IL-17RA e IL-17RC como IL-17A e IL-17F. Las funciones biológicas de IL-17AF son similares a las de IL-17A e IL-17F. La estimulación de células diana por IL-17AF induce la producción de una diversidad de quimiocinas, además de neutrofilia en las vías respiratorias en circunstancias apropiadas. Se considera que la IL-17AF es menos potente en estas actividades que la IL-17A homodimérica, pero más potente que la IL-17F homodimérica. Por ejemplo, si la potencia de IL-17A es 1, entonces la potencia relativa de IL-17AF es aproximadamente 1/10 la de IL-17A y la potencia relativa de IL-17F es aproximadamente 1/100 la de IL-17A. La IL-17AF humana y de ratón muestran ambas actividades en células de ratón. La IL-17AF consiste en un total de 271 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 30,7 kDa (datos de la descripción del producto de Heterodímero de IL-17AF Humana de Shenandoah Biotechnology).

20 Se han publicado varias estructuras cristalinas pertinentes. Estas incluyen la estructura cristalina de IL-17F homodimérica (Hymowitz *et al.* 2001, EMBO J, 19:5332-5341).

25 La estructura cristalina de IL-17F en complejo con el receptor IL-17RA también se ha publicado (Ely *et al.*, 2009 Nature Immunology 10:1245-1251). Además, se ha publicado al menos una estructura cristalina de IL-17A en complejo con el fragmento Fab de un anticuerpo (Gerhardt *et al.*, 2009 Journal of Molecular Biology, 5:905-921).

30 Varias enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, incluyendo la psoriasis, están ligadas a respuestas exacerbadas de Th1 y/o Th17. Muchas de ellas se tratan actualmente con inmunodepresores generales o biofármacos de acción muy selectiva tales como anticuerpos anti-TNF- α que no son eficaces en todos los pacientes. Se descubrió que estos aumentaban el riesgo de infecciones y que llegaban a ser ineficaces después de un tratamiento repetido. Por lo tanto, hay una necesidad médica insatisfecha de tratamientos con perfiles de seguridad aumentados y capacidad simultánea de inducir remisión a largo plazo o cura de la enfermedad.

35 Se ha informado de numerosas funciones inmunorreguladoras para la familia de citocinas de IL-17, supuestamente debido a su inducción de muchas moléculas de inmunoseñalización. La función más destacable de IL-17A es su implicación en la inducción y mediación de respuestas proinflamatorias. La IL-17A también está asociada con respuestas alérgicas. La IL-17 induce la producción de muchas otras citocinas (tales como IL-6, G-CSF, GM-CSF, IL-1 β , TGF- β , TNF- α), quimiocinas (incluyendo IL-8, GRO- α y MCP-1) y prostaglandinas (por ejemplo, PGE2) desde muchos tipos celulares (fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, queratinocitos y macrófagos). La liberación de citocinas causa muchas funciones, tales como remodelado de las vías respiratorias, una característica de las respuestas de IL-17A. La expresión aumentada de quimiocinas atrae a otras células, incluyendo neutrófilos, pero no eosinófilos. La función de IL-17 también es esencial para un subconjunto de linfocitos T CD4+ llamado linfocitos T auxiliares 17 (Th17). Como resultados de estas funciones, la familia de IL-17 se ha ligado a muchas enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario/autoinmunitarias incluyendo artritis reumatoide, asma, lupus, rechazo de aloinjerto e inmunidad antitumoral (Aggarwal S, Gurney AL 2002, J. Leukoc. Biol. 71:1-8). Además, se han establecido relaciones con afecciones adicionales tales como artrosis, septicemia, choque séptico o endotóxico, reacciones alérgicas, disminución de masa ósea, psoriasis, isquemia, esclerosis sistémica, fibrosis y apoplejía.

45 Se han generado y propuesto varios anticuerpos contra IL-17A para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos mediados por IL-17A, incluyendo los anticuerpos enumerados en el documento WO2011053763 (Centocor) y el documento WO2012093254 (UCB Pharma). Además, el documento US20070218065 (Zymogenetics) describe anticuerpos que se unen a heterodímeros de IL-17A y F, así como a IL-17F homodimérica. Se han descrito anticuerpos anti-IL-17 con reactividad cruzada de especie en la técnica, incluyendo el documento WO2007149032 (AstraZeneca), que describe un anticuerpos anti-IL-17A humana que se une a IL-17A humana, de macaco (mac) y perro, pero no a IL-17A murina. Asimismo, el documento WO2007070750 (Eli Lilly) describe un anticuerpo anti-IL-17 humana (mAb126), que se une a IL-17 humana y de macaco, pero no a IL-17 de rata o ratón. También hay disponibles anticuerpos contra IL-17A como herramienta, que incluyen el anticuerpo murino eBio64DEC17 que reconoce tanto IL-17A de ratón como humana, así como otras varias especies.

60 Por tanto, hay una necesidad de anticuerpos específicos que antagonicen los efectos de IL-17A, tenga reactividad cruzada con múltiples especies y puedan inhibir la actividad inducida por IL-17A, y especialmente composiciones y métodos de uso para dichos anticuerpos para tratar trastornos patológicos que pueden tratarse mediante la inhibición de la señalización de IL-17A.

Sumario de la invención

65

5 Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo humano terapéutico aislado o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada (V_H) de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 y una región variable de cadena ligera (V_L) de acuerdo con la SEQ ID NO: 43, y en el que dicho anticuerpo o molécula se une específicamente a IL-17A homodimérica y IL-17AF heterodimérica, pero no se une específicamente a IL-17F homodimérica.

10 En una realización, la IL-17A, IL-17AF o IL-17F se selecciona de una o más, tal como dos o tres o más, de macaco cangrejero, macaco de la India, tití, rata, ratón o ser humano. En una realización específica, la IL-17A, IL-17AF o IL-17F es de ser humano. En una realización específica, la IL-17A, IL-17AF o IL-17F es de ser humano y ratón. En una realización específica, la IL-17A, IL-17AF o IL-17F es de macaco cangrejero, macaco de la India, tití, rata, ratón y ser humano.

15 En una realización específica, el anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo comprende las CDR de cadena pesada, en secuencia, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 3 y las CDR de cadena ligera, en secuencia, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 11.

20 En una realización específica, el anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo comprende una cadena pesada de inmunoglobulina de acuerdo con la SEQ ID NO: 14, y una cadena ligera de inmunoglobulina de acuerdo con la SEQ ID NO: 44.

En un aspecto de la divulgación, se proporciona un anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo, que se une al mismo epítipo que un anticuerpo aislado o molécula de acuerdo con realizaciones específicas de la divulgación.

25 En una realización, el anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo se une a un epítipo de IL-17A, tal como un epítipo de IL-17A humana, que comprende Arg78, Glu80 y Trp90.

El epítipo de IL-17A puede comprender además Tyr85 o Arg124.

30 En una realización, el epítipo de IL-17A, tal como un epítipo de IL-17A humana, comprende además uno o más de Pro82, Ser87 o Val88.

35 En un aspecto de la divulgación, se proporciona un anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una superficie de reconocimiento de antígeno que tiene características de reconocimiento de epítipo equivalentes a un anticuerpo o molécula de acuerdo con realizaciones específicas.

En un aspecto de la divulgación, se proporciona un anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo que se bloquea de forma cruzada para unirse a IL-17A, tal como IL-17A humana, o IL-17AF, tal como IL-17AF humana, por al menos un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con realizaciones específicas.

40 En una realización, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo no se une específicamente a a) uno cualquiera o más de homodímero de IL-17F, homodímero de IL-17B, homodímero de IL-17C, homodímero de IL-17D, homodímero de IL-17E humana y/o b) uno cualquiera o más de homodímero de IL-17F de macaco cangrejero, homodímero de IL-17F de ratón y/o c) una cualquiera o más de otras citocinas humanas seleccionadas del grupo que consiste en IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, gIFN, TNF alfa, EGF, GMCSF, TGF beta 2 y/o d) una cualquiera o más de otras citocinas de ratón, seleccionadas del grupo que consiste en IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-12, IL18, IL23, IFN o TNF.

50 En una realización, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se une a IL-17A, tal como IL-17A humana, de modo que el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo inhibe o bloquea la unión entre IL-17A y su receptor, y reduce o neutraliza la actividad de IL-17A.

55 En una realización, la afinidad de unión del anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo por IL-17A humana es de 100 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 pM o menos, o 10 pM o menos medida por Biacore™. En una realización específica, la afinidad de unión del anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo por IL-17A humana está por debajo de 200 pM, o por debajo de 100 pM, medida por Biacore™.

En una realización, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo puede inhibir la secreción de IL-6, o la secreción de GRO-alfa cuando se evalúa *in vitro*, preferiblemente usando condrocitos o fibroblastos cultivados.

60 En una realización, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo puede inhibir la inflamación de rodilla en un modelo de reumatismo articular experimental inducido por antígeno *in vivo*, tal como un modelo de rata de AIA.

En una realización, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se conjuga con un resto activo adicional.

65 El anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo puede ser un anticuerpo monoclonal o una parte de unión a antígeno del mismo, preferiblemente un anticuerpo quimérico, humanizado o humano o parte del mismo.

En un aspecto de la divulgación, se proporciona una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con realizaciones de la divulgación, en combinación con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

5 En una realización, la composición farmacéutica comprende uno o más principios activos adicionales.

En una realización específica, dicha composición farmacéutica es un liofilizado. En otra realización específica, la composición farmacéutica es una formulación líquida que comprende una cantidad terapéuticamente aceptable de un anticuerpo o molécula de la divulgación, preferiblemente preparada como una jeringa prellenada.

10 La divulgación se refiere además al uso de dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la divulgación, por ejemplo, anticuerpos XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5, para su uso como medicamento, más preferiblemente, para el tratamiento de un trastorno patológico que está mediado por IL-17A o que puede tratarse mediante la inhibición de la señalización de IL-17A, o la secreción de IL-6 o GRO-alfa.

15 En una realización específica, los anticuerpos o parte de unión a antígeno de los mismos de la divulgación pueden usarse para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios e inflamatorios, tales como reumatismo articular, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lupus eritematoso diseminado (LED), nefritis lúpica, asma, esclerosis múltiple o fibrosis quística.

En un aspecto de la divulgación, se proporciona un uso de dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la divulgación, por ejemplo, anticuerpos XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5, en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de un trastorno patológico mediado por IL-17A o que puede tratarse mediante la inhibición de la secreción de IL-6 o GRO-alfa.

25 En una realización específica, el trastorno patológico mediado por IL-17A o que puede tratarse mediante la inhibición de la secreción de IL-6 o GRO-alfa es un trastorno o afección inflamatoria, tal como reumatismo articular, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lupus eritematoso diseminado (LED), nefritis lúpica, asma, esclerosis múltiple o fibrosis quística.

30 En un aspecto de la divulgación, se proporciona un método de tratamiento de un trastorno patológico mediado por IL-17A, o que puede tratarse mediante la inhibición de la secreción de IL-6 o GRO-alfa, comprendiendo dicho método administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la divulgación, por ejemplo, anticuerpos XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5, de modo que se alivie la afección.

35 En una realización, la afección es un trastorno o afección inflamatoria, tal como reumatismo articular, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lupus eritematoso diseminado (LED), nefritis lúpica, asma, esclerosis múltiple o fibrosis quística.

40 La divulgación también se refiere al medio para producir los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos de la divulgación. Dicho medio incluye moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican al menos la una o más regiones variables pesada y/o ligera del anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la divulgación o vectores de expresión de clonación que comprenden dichos ácidos nucleicos, en particular, para la producción recombinante de un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la divulgación, por ejemplo, XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5, en una célula hospedadora. En una realización específica, dicho vectores de clonación o expresión comprende al menos una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 18, 31, 51, 19, 28, 32, 38, 40, 46, 48, 52, 56 y 58. En otra realización, comprende al menos una de las siguientes secuencias codificantes de secuencias de cadena pesada y ligera variable seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 16, 29, 49, 17, 27, 30, 37, 39, 45, 47, 50, 55 y 57, unidas de forma funcional a secuencias promotoras adecuadas, que son bien conocidas por los expertos en la materia.

En una realización, la molécula de ácido nucleico es un ARN mensajero (ARNm).

55 La divulgación se refiere además a una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de clonación o expresión como se describe anteriormente y al proceso para la producción de un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la divulgación, por ejemplo, XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5, comprendiendo dicho proceso cultivar la célula hospedadora, purificar y recuperar dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo.

60 **Definiciones**

Para que la presente divulgación pueda entenderse más fácilmente, en primer lugar se definen determinados términos. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

La expresión "respuesta inmunitaria" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citocinas y el complemento) que provoca daño selectivo en, destrucción o eliminación del organismo humano de los patógenos invasores, las células o tejidos infectados con patógenos, las células cancerosas o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Una "ruta de transducción de señales" o "actividad de señalización" se refiere a una relación causal bioquímica generalmente iniciada mediante una interacción de proteína-proteína tal como la unión de un factor de crecimiento a un receptor, que provoca la transmisión de una señal desde una parte de una célula hasta otra parte de una célula. En general, la transmisión implica fosforilación específica de uno o más restos de tirosina, serina o treonina en una o más proteínas en la serie de reacciones que causa la transducción de señales. Los penúltimos procesos incluyen generalmente eventos nucleares, que provocan un cambio en la expresión génica.

Un "anticuerpo" de origen natural es una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones flanqueantes (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amínico hasta el extremo carboxílico en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a factores o tejidos hospedadores, que incluyen diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

Las expresiones "región determinante de complementariedad" y "CDR", como se usan en este documento, se refieren a las secuencias de aminoácidos dentro de las regiones variables del anticuerpo que confieren especificidad y afinidad de unión por el antígeno. En general, hay tres CDR en cada región variable de cadena pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y tres CDR en cada región variable de cadena ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada pueden determinarse usando cualquiera de varios esquemas bien conocidos, incluyendo los descritos por Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5.^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (esquema de numeración de "Kabat"), Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273, 927-948 (esquema de numeración de "Chotia"). Por ejemplo, para formatos clásicos, según Kabat, los restos aminoacídicos de CDR en el dominio variable de cadena pesada (V_H) están numerados 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3); y los restos aminoacídicos de CDR en el dominio variable de cadena ligera (V_L) están numerados 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3). Según Chotia, los aminoácidos de CDR en V_H están numerados 26-32 (HCDR1'), 52-56 (HCDR2') y 95-102 (HCDR3'); y los restos aminoacídicos en V_L están numerados 26-32 (LCDR1'), 50-52 (LCDR2') y 91-96 (LCDR3'). Combinando las definiciones de CDR tanto de Kabat como de Chotia, las CDR consisten en los restos aminoacídicos 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) y 95-102 (HCDR3) en V_H humana y los restos aminoacídicos 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) y 89-97 (LCDR3) en V_L humana.

La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de antígeno"), como se usa en este documento, se refiere a la longitud completa o uno o más fragmentos de un anticuerpo, tal como una proteína, que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, una parte de IL-17A). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo pueden realizarla fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y CH1; un fragmento F(ab)₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; un fragmento F_d que consiste en los dominios V_H y CH1; un fragmento F_v que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward *et al.* 1989, Nature 341:544-546), que consiste en un dominio V_H; y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, o cualquier proteína de fusión que comprenda dicha parte de unión a antígeno.

Por consiguiente, la expresión "parte de unión a antígeno" también puede hacer referencia a las partes correspondientes al anticuerpo de la divulgación que pueden estar comprendidas dentro de estructuras o armazones alternativos tales como anticuerpos de camélido o moléculas "que no son anticuerpo" como se describe a continuación.

Además, aunque los dos dominios del fragmento F_v, V_L y V_H, están codificados por genes diferentes, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que posibilite prepararlos como una proteína monocatenaria en que las regiones V_L y V_H se emparejen para formar moléculas monovalentes (conocido como F_v monocatenario (scFv)); véase, por ejemplo, Bird *et al.* 1988, Science 242:423-426; y Huston *et al.* 1988, Proc. Natl.

Acad. Sci. 85:5879-5883). Se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios también estén englobados dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, y los fragmentos se seleccionan en función de su utilidad de la misma manera que para los anticuerpos intactos.

5 Un "anticuerpo aislado", como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo que están sustancialmente libre de otros anticuerpos que tengan diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se una específicamente a IL-17A, tal como IL-17A humana, está sustancialmente libre de anticuerpos que se unan específicamente a otros antígenos distintos de IL-17A). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a IL-17A
10 puede tener, sin embargo, reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de IL-17A de otras especies, o heterodímeros de IL-17A, tales como IL-17AF. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otro material celular y/o productos químicos.

15 Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usan en este documento, se refieren a un preparado de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal tiene una especificidad y afinidad de unión únicas por un epítipo particular.

El término IL-17A se refiere a IL-17A humana como se define en la SEQ ID NO: 76 o SEQ ID NO: 78 salvo que se describa de otro modo. El término IL-17F se refiere a IL-17F humana como se define en la SEQ ID NO: 77 salvo que se describa de otro modo. La IL-17AF es un heterodímero de una subunidad IL-17A y una subunidad IL-17F, como apreciará un experto en la materia. Se usaron proteínas recombinantes, indicadas con el prefijo "r", de diferentes especies en los ensayos descritos a continuación. Por ejemplo, la IL-17A humana recombinante se indica rhuIL-17. Un experto en la materia conoce la manera de expresar dichas proteínas usando materiales de partida y protocolos convencionales conocidos en la técnica. Sin embargo, para ayudar al experto en la materia, salvo que se indique otra cosa, pueden usarse las siguientes secuencias de aminoácidos: IL-17A de macaco cangrejero (mac), SEQ ID NO: 79; maIL-17F, SEQ ID NO: 80; IL-17A de macaco de la India (rhesus), SEQ ID NO: 81; IL-17A de tití (tití), SEQ ID NO: 82; IL-17A de ratón (m), SEQ ID NO: 83; mL-17F, SEQ ID NO: 84, IL-17A de rata, SEQ ID NO: 85; receptor A de IL-17 humana (huIL-17RA), SEQ ID NO: 86. Como sabe un experto en la materia, las secuencias mencionadas anteriormente pueden variar ligeramente, es decir, debido a que son originarias de diferentes grupos de población. En los ejemplos, los anticuerpos como herramienta también se usan, por ejemplo, con fines de cribado. Dichos anticuerpos son anticuerpos convencionales y pueden obtenerlos fácilmente los expertos en la materia.

El término "epítipo" significa un determinante proteínico con capacidad de unión específica a un anticuerpo. Los epítipos habitualmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales glucídicas y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión de los primeros, pero no de los últimos, se pierde en presencia de disolventes desnaturantes.

El término "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgE, IgG tal como IgG1 o IgG4) proporcionada por los genes de la región constante de cadena pesada. El isotipo también incluye versiones modificadas de una de estas clases, donde las modificaciones se han hecho para alterar la función de Fc, por ejemplo, para potenciar o reducir las funciones efectoras o la unión a receptores de Fc.

Se pretende que la expresión "anticuerpo humano", como se usa en este documento, incluya anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones flanqueantes como las CDR derivan de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de dichas secuencias humanas, por ejemplo, secuencias de la línea germinal humana, o versiones mutantes de secuencias de la línea germinal humana o anticuerpo que contiene secuencias flanqueantes consenso derivadas de análisis de secuencias flanqueantes humanas, por ejemplo, como se describe en Knappik, *et al.* 2000, J Mol Biol 296:57-86).

Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo que conserva la reactividad de un anticuerpo no humano a la vez que es menos inmunógeno en seres humanos. Esto puede conseguirse, por ejemplo, conservando las regiones CDR no humanas y reemplazando las partes restantes del anticuerpo con sus equivalentes humanos (es decir, la región constante, así como las partes flanqueantes de la región variable). Véase, por ejemplo, Morrison *et al.* 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855; Morrison y Oi, 1988, Adv. Immunol., 44:65-92; Verhoeyen *et al.* 1988, Science, 239:1534-1536; Padlan 1991, Molec. Immun., 28:489-498; y Padlan 1994, Molec. Immun., 31:169-217. Otros ejemplos de tecnología de ingeniería humana incluyen, aunque sin limitación, la tecnología Xoma divulgada en el documento US 5766886.

Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir restos aminoacídicos no codificados por secuencias humanas (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, no se pretende que la expresión "anticuerpo humano", como se usa en este documento, incluya anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias flanqueantes humanas.

La expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión, que tienen regiones variables en las que tanto las regiones flanqueantes como CDR derivan de secuencias humanas.

- 5 La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en este documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por un medio recombinante, tales como anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcrómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos, anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para que exprese el anticuerpo humano, por ejemplo, a partir de un transfectoma, anticuerpos aislados de una colección combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique ajuste de la totalidad o una parte de la una secuencia génica de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones flanqueantes y CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En determinadas realizaciones, sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de y están relacionadas con las secuencias de V_H y V_L de la línea germinal, no pueden existir de forma natural dentro del repertorio anticuerpos de la línea germinal humana *in vivo*.
- 10
- 15
- 20 Como se usa en este documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM, IgE, IgG, tal como IgG1 o IgG4) proporcionada por los genes de la región constante de cadena pesada.

Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en este documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

- 25 Como se usa en este documento, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que "se une específicamente al polipéptido IL-17A" pretende hacer referencia a un anticuerpo o partes de unión a antígeno del mismo que se une al polipéptido IL-17A humano con una K_D de 100 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 pM o menos, o 10 pM o menos. Un anticuerpo que "reacciona de forma cruzada con un antígeno distinto de IL-17A" pretende hacer referencia a un anticuerpo que se une a ese antígeno con una K_D de 10 nM o menos, 1 nM o menos, o 100 pM o menos. Un anticuerpo que "no reacciona de forma cruzada con un antígeno particular" pretende hacer referencia a un anticuerpo que se une a ese antígeno, con una K_D de 100 nM o mayor, o una K_D de 1 μM o mayor, o una K_D de 10 μM o mayor. En determinadas realizaciones, dichos anticuerpos que no reaccionan de forma cruzada con el antígeno muestran una unión esencialmente indetectable frente a estas proteínas en ensayos de unión convencionales.
- 30
- 35

El término "K_{asoc}" o "K_a", como se usa en este documento, pretende hacer referencia a la velocidad de asociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno, mientras que el término "K_{dis}" o "K_d," como se usa en este documento, pretende hacer referencia a la velocidad de disociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno.

- 40 El término "K_D", como se usa en este documento, pretende hacer referencia a la constante de disociación, que se obtiene del cociente de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de K_D para los anticuerpos se pueden determinar usando métodos muy consolidados en la técnica. Un método para determinar la K_D de un anticuerpo es usando resonancia de plasmones superficiales, o usando un sistema de biosensor tal como un sistema Biacore™, bien conocido por los expertos en la materia y manejado, por ejemplo, como se describe en los ejemplos.
- 45

La inhibición de la unión de IL-17 a su receptor puede ensayarse convenientemente en diversos ensayos, incluyendo ensayos que se describen posteriormente en este documento en el texto. Por la expresión "al mismo grado" se entiende que las moléculas de referencia y las equivalentes muestran, en una base estadística, actividad inhibidora de IL-17 esencialmente idéntica en uno de los ensayos mencionados en este documento (véanse los ejemplos). Por ejemplo, las moléculas de unión a IL-17 de la divulgación típicamente tienen una concentración inhibidora de la mitad del máximo (CI₅₀), para la inhibición de IL-17 humana sobre la producción de IL-6 inducida por IL-17 humana en fibroblastos dérmicos humanos, que está dentro de +/-10⁵, es decir, por debajo de 10 nM, más preferiblemente de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 nM de la de, preferiblemente sustancialmente igual que, la CI₅₀ de la molécula de referencia respectiva cuando se ensaya, por ejemplo, como se describe en los ejemplos. Como alternativa, el ensayo usado puede ser un ensayo de inhibición competitiva de la unión de IL-17 por receptores solubles de IL-17 y las moléculas de unión a IL-17 de la divulgación.

50

55

- 60 Como se usa en este documento, el término "afinidad" se refiere a la fuerza de la interacción entre el anticuerpo y el antígeno en sitios antigénicos individuales. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del "brazo" de anticuerpo interactúa a través de fuerzas no covalentes débiles con el antígeno en numerosos sitios; cuantas más interacciones, más fuerte será la afinidad. Como se usa en este documento, la expresión "alta afinidad" para un anticuerpo IgG o fragmento del mismo (por ejemplo, un fragmento Fab) se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10⁻⁸ M o menos, 10⁻⁹ M o menos, o 10⁻¹⁰ M, o 10⁻¹¹ M o menos, o 10⁻¹² M o menos, o 10⁻¹³ M o menos por ese antígeno diana. Sin
- 65

embargo, la unión de alta afinidad puede variar para otros isotipos de anticuerpo. Por ejemplo, la unión de alta afinidad para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10^{-7} M o menos, o 10^{-8} M o menos.

5 Como se usa en este documento, el término "avidez" se refiere a una medida informativa de la estabilidad global o fuerza del complejo de anticuerpo-antígeno. Está controlada por tres factores principales: afinidad del epítipo del anticuerpo; la valencia tanto del antígeno como del anticuerpo; y la disposición estructural de las partes que interactúan. En última instancia, estos factores definen la especificidad del anticuerpo, es decir, la probabilidad de que el anticuerpo particular se una a un epítipo antigénico preciso.

10 Como se usa en este documento, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que inhibe la unión de IL-17A a IL-17R pretende hacer referencia a un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que inhibe la unión de IL-17A a IL-17R con una CI_{50} de 10 nM o menos, preferiblemente con una CI_{50} de 1 nM o menos, más preferiblemente con una CI_{50} de 100 pM o menos, medida en un ensayo de unión competitiva *in vitro*. Dicho ensayo se describe en mayor detalle en los ejemplos a continuación.

15 Como se usa en este documento, la expresión "antagonista de IL-17A" o "molécula de bloqueo de IL-17A" pretende hacer referencia a un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que inhibe la actividad de señalización inducida por IL-17A a través del IL-17R y, de ese modo, reduce o neutraliza la actividad de IL-17A. Esto puede demostrarse en un ensayo de células humanas tal como el ensayo de producción de IL-6 o GRO-alfa dependiente de IL-17A en células humanas. Dicho ensayo se describe en mayor detalle en los ejemplos a continuación. En algunas realizaciones, los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos de la divulgación inhiben la producción de IL-6 o GRO-alfa dependiente de IL-17A medida en un ensayo de células humanas *in vitro* a una CI_{50} de 10 nM o menos, 1 nM o menos, o 100 pM o menos. Dicho ensayo se describe en mayor detalle en los ejemplos a continuación. En algunas realizaciones, los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos de la divulgación inhiben el reumatismo articular inducido por antígeno en ensayos *in vivo* en ratones y ratas. Dichos ensayos se describen en los ejemplos en mayor detalle a continuación.

25 Como se usa en este documento, el término actividad de "ADCC" o "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" se refiere a actividad de reducción celular. La actividad de ADCC puede medirse por ensayo de ADCC convencional, bien conocido por los expertos en la materia.

30 Como se usa en este documento, el término "selectividad" para un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la divulgación se refiere a un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo que se une a determinado polipéptido diana, pero no a polipéptidos muy relacionados. Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en este documento con la expresión "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

35 La expresión "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o ácidos ribonucleicos (ARN) y polímeros de los mismos, en forma mono- o bicatenaria. Salvo que se limite de forma específica, la expresión engloba ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de manera similar a la de los nucleótidos de origen natural. (Véase la patente de Estados Unidos n.º 8278036 de Kariko *et al.*, que divulga moléculas de ARNm con uridina remplazada por pseudouridina, métodos de síntesis de las mismas y métodos para el suministro de proteínas terapéuticas *in vivo*.) Pueden usarse métodos para empaquetar ARNm, por ejemplo, los divulgados en la patente de Estados Unidos n.º 8278036 de Kariko *et al.*; y la solicitud de patente WO 2013/090186A1, de Moderna. Salvo que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular también engloba de forma implícita variantes modificadas de forma conservativa de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada de forma explícita. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados pueden conseguirse generando secuencias en que la

40 45 50

tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con restos de base mixta y/o de desoxiinosina (Batzner *et al.*, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); y Rossolini *et al.*, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

55 Como se usa en este documento, el término "sujeto" incluye cualquier ser humano o animal no humanos. La expresión "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc. Como se usa en este documento, el término "mac" o "macaco" se refiere al macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*). Como se usa en este documento, el término "rhesus" o "*Macacus rhesus*" se refiere al macaco de la India (*Macaca mulatta*). Como se usa en este documento, el término "tití" se refiere a un mono tití.

60 Como se usa en este documento, el término "tratar" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno (es decir, artritis reumatoide) se refiere, en una realización, a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, ralentizar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico, incluyendo aquellos que pueden no ser discernibles por el paciente. En otra realización más, "tratar" o "tratamiento" se refiere a modular la enfermedad o

65

trastorno, físicamente (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico), o ambos. Los métodos para evaluar el tratamiento y/o prevención de enfermedades son conocidos en general en la técnica, salvo que se describa específicamente en este documento.

5 Como se usa en este documento, "seleccionar" y "seleccionado", en referencia a un paciente, se usa para indicar que un paciente particular se elige específicamente de un grupo más grande de pacientes debido a que el paciente particular tiene un criterio predeterminado. Asimismo, "tratar selectivamente a un paciente" se refiere a proporcionar tratamiento a un paciente que se elige específicamente de un grupo más grande de pacientes debido a que el paciente particular tiene un criterio predeterminado. Asimismo, "administrar selectivamente" se refiere a administrar un fármaco
10 a un paciente que se elige específicamente de un grupo más grande de pacientes debido a que el paciente particular tiene un criterio predeterminado.

Como se usa en este documento, el término "optimizada" significa que una secuencia de nucleótidos se ha alterado para que codifique una secuencia de aminoácidos usando codones que son preferidos en la célula u organismo de producción, en general una célula eucariota, por ejemplo, una célula de *Pichia*, una célula de *Trichoderma*, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada se genomanipula para que retenga por completo o en la mayor medida posible la secuencia de aminoácidos originalmente codificada por la secuencia de nucleótidos de partida, que también se conoce como la secuencia "precursora". Las secuencias optimizadas en este documento se han genomanipulado para que tengan codones que son preferidos en células de mamífero CHO, sin embargo, también se prevé la expresión optimizada de estas secuencias en otras células eucariotas en este documento. Las secuencias de aminoácidos codificadas por secuencias de nucleótidos optimizadas también se denominan optimizadas.

Como se usa en este documento, el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = $n.^{\circ}$ de posiciones idénticas/ $n.^{\circ}$ total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que tienen que introducirse para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede realizarse usando un algoritmo matemático, como se describe a continuación.

30 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller 1988, *Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17, que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos ponderados PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Como alternativa, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch 1970, *J. Mol. Biol.* 48:444-453 que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de programas informáticos GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), que usa una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y una ponderación de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una ponderación de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

40 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos nucleotídicas también puede determinarse usando, por ejemplo, algoritmos tales como el programa BLASTN para secuencias de ácido nucleico usando, por defecto, una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4 y una comparación de ambas hebras.

45 Las expresiones "bloquear de forma cruzada", "bloqueado de forma cruzada", "bloqueo cruzado" se usan indistintamente en este documento para indicar la capacidad de un anticuerpo u otro agente de unión de interferir con la unión de otros anticuerpos o agentes de unión a IL-17A en un ensayo de unión competitiva convencional.

50 La capacidad o grado al que un anticuerpo u otro agente de unión, tal como una parte de unión a antígeno de un anticuerpo, puede interferir con la unión de otro anticuerpo o molécula de unión a IL-17A y, por lo tanto, si puede decirse que se bloquea de forma cruzada de acuerdo con la divulgación, puede determinarse usando ensayos de unión competitiva convencionales. Un ensayo adecuado implica el uso de la tecnología Biacore™ (por ejemplo, usando el instrumento Biacore™ 3000 (Biacore™, Uppsala, Suecia)), que puede medir el grado de interacciones usando tecnología de resonancia de plasmones superficiales. Otro ensayo para medir el bloqueo cruzado usa una estrategia basada en ELISA. Se dan detalles adicionales sobre estos métodos en los ejemplos.

55 Por ejemplo, los anticuerpos ejemplificados en este documento (es decir, XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5) y partes de unión a antígeno de los mismos todos se "bloquearán de forma cruzada" entre sí. Todos estos anticuerpos abordan el mismo epítipo en IL-17A. Se esperaría que otros anticuerpos de bloqueo cruzado se unirán al mismo epítipo, o uno relacionado.

60 De acuerdo con la divulgación, un anticuerpo de bloqueo cruzado u otro agente de unión, tal como una parte de unión a antígeno de un anticuerpo, de acuerdo con la divulgación, se une a IL-17A en el ensayo de bloqueo cruzado de Biacore™ descrito, de modo que la unión registrada de la combinación (mezcla) de los anticuerpos o agentes de unión es entre un 80 % y un 0,1 % (por ejemplo, de un 80 % a un 4 %) de la unión teórica máxima, específicamente entre un 75 % y un 0,1 % (por ejemplo, de un 75 % a un 4 %) de la unión teórica máxima, y más específicamente entre un
65 70 % y un 0,1 % (por ejemplo, de un 70 % a un 4 %), y más específicamente entre un 65 % y un 0,1 % (por ejemplo,

de un 65 % a un 4 %) de la unión teórica máxima (como se define anteriormente) de los dos anticuerpos o agentes de unión en combinación.

5 Un anticuerpo se define de bloqueo cruzado en el ensayo de ELISA como se describe en los ejemplos, si el anticuerpo anti-IL-17A en fase de solución puede causar una reducción entre un 60 % y un 100 %, específicamente entre un 70 % y un 100 %, y más específicamente entre un 80 % y un 100 % de la señal de detección de IL-17A (es decir, la cantidad de IL-17A unida por el anticuerpo recubierto) en comparación con la señal de detección de IL-17A obtenida en ausencia del anticuerpo anti-IL-17A en fase de solución (es decir, los pocillos de control positivo).

10 Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se basa, en parte, en el descubrimiento de moléculas de anticuerpo que se unen específicamente a IL-17A homodimérica e IL-17AF heterodimérica, pero no se unen específicamente a IL-17F homodimérica. La divulgación se refiere tanto a anticuerpos en formato de IgG completa como a partes de unión a antígeno de los mismos, que se describirán adicionalmente a continuación.

15 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona anticuerpos, así como partes de unión a antígeno de los mismos con capacidades de unión que son sorprendentemente similares para varias especies, tales como seleccionadas de una o más de macaco cangrejero, macaco de la India, tití, rata, ratón o ser humano, así como composiciones farmacéuticas, métodos de producción y métodos de uso de dichos anticuerpos y composiciones.

Anticuerpos recombinantes

25 Los anticuerpos de la divulgación incluyen el anticuerpo recombinante humano XAB1 y los derivados de anticuerpo XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5, que se obtienen, aíslan y caracterizan estructuralmente por sus secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de longitud completa como se describe en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de longitud completa de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5.

Anticuerpo	Cadena pesada de longitud completa Secuencia de aminoácidos	Cadena ligera de longitud completa Secuencia de aminoácidos
XAB1	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15
XAB2	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 26
XAB3	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 36
XAB4	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 44
XAB5	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 54
IDENTIDAD DE SECUENCIA	100%	97%

30 Las regiones variables correspondientes, las secuencias de aminoácidos de V_H y V_L de dichos anticuerpos aislados XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 de la divulgación se muestran en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera variable de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5.

Anticuerpo	Cadena pesada variable Secuencia de aminoácidos	Cadena ligera variable Secuencia de aminoácidos
XAB1	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13
XAB2	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 25
XAB3	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 35
XAB4	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 43
XAB5	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 53
IDENTIDAD DE SECUENCIA	100%	94%

35 Otros anticuerpos de la divulgación incluyen los que tienen aminoácidos que se han mutado por eliminación, inserción o sustitución de aminoácidos, pero tienen al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con los anticuerpos descritos anteriormente, en particular en las regiones CDR representadas en las secuencias descritas anteriormente. En algunas realizaciones, el anticuerpo de la divulgación es una variante mutante de uno cualquiera de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5, en el que dicho anticuerpo variante mutante incluye secuencias de aminoácidos mutantes en las que no más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos se han mutado por eliminación, inserción o sustitución de aminoácidos en las regiones CDR en comparación con las regiones CDR representadas en las secuencias descritas anteriormente.

45 Las secuencias codificantes de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada de longitud completa de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 se muestran en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Secuencias codificantes de ADN de cadena pesada y ligera de longitud completa.

Anticuerpo	Cadena pesada de longitud completa Secuencia codificante de ADN	Cadena ligera de longitud completa Secuencia codificante de ADN
XAB1	SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 19
XAB2	SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 32
XAB3	SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40
XAB4	SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 52
XAB5	SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58

5 Las secuencias codificantes de nucleótidos de las cadenas ligera y pesada variable de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 se muestran en la tabla 4 a continuación.

Tabla 4. Secuencias codificantes de ADN de secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera variable.

Anticuerpo	Cadena pesada variable Secuencia codificante de ADN	Cadena ligera variable Secuencia codificante de ADN
XAB1	SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 17
XAB2	SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 30
XAB3	SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39
XAB4	SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 50
XAB5	SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57

10 Otros ácidos nucleicos que codifican anticuerpos de la divulgación incluyen ácidos nucleicos que se han mutado por eliminación, inserción o sustitución de nucleótidos, pero tienen al menos un 60, 70, 80, 90, 95 o 100 por ciento de identidad con las regiones codificantes correspondientes de CDR representadas en las secuencias descritas anteriormente o en la tabla 5 y tabla 6 a continuación.

15 En algunas realizaciones, incluyen ácidos nucleicos variantes en los que no más de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos se han cambiado por eliminación, inserción o sustitución de nucleótidos en las regiones codificantes de CDR con las regiones codificantes de CDR representadas en las secuencias descritas anteriormente o en la tabla 5 y tabla 6 a continuación.

20 Para anticuerpos que se unen al mismo epítipo, las secuencias de V_H, V_L, cadena ligera de longitud completa y cadena pesada de longitud completa (secuencias de nucleótidos y secuencia de aminoácidos) pueden "mezclarse y acoplarse" para crear otras moléculas de unión anti-IL-17A de la divulgación. La unión a IL-17A de dichos anticuerpos "mezclados y acoplados" puede ensayarse usando los ensayos de unión descritos anteriormente u otros ensayos de unión convencionales (por ejemplo, ELISA). Cuando estas cadenas se mezclan y acoplan, una secuencia V_H de un emparejamiento V_H/V_L particular debe remplazarse con una secuencia V_H estructuralmente similar. Asimismo, una secuencia de cadena pesada de longitud completa de un emparejamiento de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa particular debe remplazarse con una secuencia de cadena pesada de longitud completa estructuralmente similar. Asimismo, una secuencia V_L de un emparejamiento V_H/V_L particular debe remplazarse con una secuencia V_L estructuralmente similar. Asimismo, una secuencia de cadena ligera de longitud completa de un emparejamiento de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa particular debe remplazarse con una secuencia de cadena ligera de longitud completa estructuralmente similar. Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo recombinante aislado o parte de unión a

antígeno del mismo que tiene: una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 13, 25, 35, 43 y 53; en el que dichas regiones de cadena pesada y ligera se seleccionan de modo que el anticuerpo se una específicamente a IL-17A.

- 5 Se muestran ejemplos de las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V_H (también denominadas HCDR1 o HCDR1' dependiendo de la definición de CDR que se use), CDR2 de V_H (también denominadas HCDR2 o HCDR2' dependiendo de la definición de CDR que se use), CDR3 de V_H (también denominadas HCDR1 o HCDR1' dependiendo de la definición de CDR que se use), CDR1 de V_L (también denominadas LCDR1 o LCDR1' dependiendo de la definición de CDR que se use), CDR2 de V_L (también denominadas LCDR2 o LCDR2' dependiendo de la definición de CDR que se use), CDR3 de V_L (también denominadas HCDR3 o HCDR3' dependiendo de la definición de CDR que se use) de algunos anticuerpos y partes de unión a antígeno de los mismos de acuerdo con la divulgación en la tabla 5 y tabla 6.
- 10
- 15 En la tabla 5, las regiones CDR de algunos anticuerpos de la divulgación se delimitan usando el sistema de Kabat (Kabat, E. A., *et al.* 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación NIH n.º 91-3242, véase también Zhao y Lu 2009, Molecular Immunology 47:694-700).
- 20 Para facilitar la lectura, cuando las regiones CDR se delimitan de acuerdo con la definición de Kabat, se denominan en adelante HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, respectivamente.

Tabla 5. Regiones CDR de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 de acuerdo con la definición de Kabat.

Anticuerpo original	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
XAB1	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11
XAB2	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 24
XAB3	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 11
XAB4	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 11
XAB5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11
CONSENSO	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 75
IDENTIDAD DE SECUENCIA	100%	100%	100%	64 %	86%	89%

- 25 Las secuencias consenso SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 y SEQ ID NO: 75 comprenden varios aminoácidos variables, denominados X. Basándose en la alineación de secuencias de las secuencias para XAB2 a XAB5, los cuatro aminoácidos variables de la SEQ ID NO: 73 pueden seleccionarse ventajosamente de acuerdo con lo siguiente: El primer aminoácido variable (X1) puede seleccionarse del grupo que consiste en Gly (G) y Val (V); el segundo aminoácido variable (X2) puede seleccionarse del grupo que consiste en Tyr (Y), Asn (N) e Ile (I); el tercer aminoácido variable (X3) puede seleccionarse del grupo que consiste en Trp (W) y Ser (S); y el cuarto aminoácido variable (X4) puede seleccionarse del grupo que consiste en Glu (E) y Ala (A). La SEQ ID NO: 9 tiene una identidad de secuencia de un 91 % en comparación con la SEQ ID NO: 22 y una identidad de secuencia de un 73 % en comparación con la SEQ ID NO: 34 y la SEQ ID NO: 42. La SEQ ID NO: 22 tiene una identidad de secuencia de un 64 % en comparación con la SEQ ID NO: 34 y la SEQ ID NO: 42. La SEQ ID NO: 34 tiene una identidad de secuencia de un 91 % en comparación con la SEQ ID NO: 42.
- 30
- 35

Asimismo, el aminoácido variable en la SEQ ID NO: 74 puede seleccionarse ventajosamente de acuerdo con lo siguiente: X1 puede seleccionarse del grupo que consiste en Asn (N) y Gln (Q). La SEQ ID NO: 10 tiene una identidad de secuencia de un 86 % en comparación con la SEQ ID NO: 23.

- 40 El aminoácido variable de la SEQ ID NO: 75 puede seleccionarse ventajosamente de acuerdo con lo siguiente: X1 puede seleccionarse del grupo que consiste en Asn (N) y Asp (D). La SEQ ID NO: 11 tiene una identidad de secuencia de un 89 % en comparación con la SEQ ID NO: 24.

- 45 En la tabla 6, se delimitan las regiones CDR de algunos anticuerpos de la divulgación usando el sistema de Chotia, Al-Lazikani *et al.* 1997, J. Mol. Biol. 273:927-948. Para facilitar la lectura, cuando las regiones CDR se delimitan de acuerdo con la definición de Chotia, se denominan en adelante HCDR1', HCDR2', HCDR3', LCDR1', LCDR2', LCDR3', respectivamente.

Tabla 6. Regiones CDR de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 de acuerdo con la definición de Chotia.

Anticuerpo original	HCDR1'	HCDR2'	HCDR3'	LCDR1'	LCDR2'	LCDR3'
XAB1	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
XAB2	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 21
XAB3	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
XAB4	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
XAB5	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
CONSENSO	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 72
IDENTIDAD DE SECUENCIA	100%	100%	100%	43%	100%	83%

5 Las secuencias consenso SEQ ID NO: 71 y SEQ ID NO: 72 comprenden varios aminoácidos variables, denominados X. Basándose en la alineación de secuencias de las secuencias para XAB2 a XAB5, los cuatro aminoácidos variables de la SEQ ID NO: 71 puede seleccionarse ventajosamente de acuerdo con lo siguiente: el primer aminoácido variable (X1) puede seleccionarse del grupo que consiste en Gly (G) y Val (V), el segundo aminoácido variable (X2) puede seleccionarse del grupo que consiste en Tyr (Y), Asn (N) e Ile (I); el tercer aminoácido variable (X3) puede seleccionarse del grupo que consiste en Trp (W) y Ser (S); y el cuarto aminoácido variable (X4) puede seleccionarse del grupo que consiste en Glu (E) y Ala (A). La SEQ ID NO: 4 tiene una identidad de secuencia de un 86 % en comparación con la SEQ ID NO: 20 y una identidad de secuencia de un 57 % en comparación con la SEQ ID NO: 33 y la SEQ ID NO: 41. La SEQ ID NO: 20 tiene una identidad de secuencia de un 43 % en comparación con la SEQ ID NO: 33 y la SEQ ID NO: 41. La SEQ ID NO: 33 tiene una identidad de secuencia de un 86 % en comparación con la SEQ ID NO: 41.

15 Asimismo, el aminoácido variable en la SEQ ID NO: 72 puede seleccionarse ventajosamente de acuerdo con lo siguiente: X1 puede seleccionarse del grupo que consiste en Asn (N) y Asp (D). La SEQ ID NO: 6 tiene una identidad de secuencia de un 86 % en comparación con la SEQ ID NO: 21.

20 Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a IL-17A y que la especificidad de unión a antígeno se proporciona principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias de CDR1, 2 y 3 de V_H y las secuencias CDR1, 2 y 3 de V_L pueden "mezclarse y acoplarse" (es decir, pueden mezclarse y acoplarse CDR de diferentes anticuerpos, conteniendo cada anticuerpo una CDR1, 2 y 3 de V_H y una CDR1, 2 y 3 V_L para crear otras moléculas de unión anti-IL-17A de la divulgación). La unión a IL-17A de dichos anticuerpos "mezclados y acoplados" puede ensayarse usando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los ejemplos u otros ensayos convencionales (por ejemplo, ELISA). Cuando las secuencias de CDR de V_H se mezclan y acoplan, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de V_H particular debe remplazarse con una o más secuencias de CDR estructuralmente similares. Asimismo, cuando las secuencias de CDR de V_L se mezclan y acoplan, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de V_L particular debe remplazarse con una o más secuencias de CDR estructuralmente similares. Será muy evidente para los expertos en la materia que pueden crearse secuencias de V_H y V_L novedosas sustituyendo una o más secuencias de una o más regiones CDR de V_H y/o V_L con secuencias estructuralmente similares de las secuencias de CDR mostradas en este documento para anticuerpos monoclonales de la presente divulgación.

35 En una realización, un anticuerpo recombinante aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, tiene: una CDR1 de región variable de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 7; una CDR2 de región variable de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 8; una CDR3 de región variable de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 3; una CDR1 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 9, 22, 34, 42 y 73, y preferiblemente seleccionada de la SEQ ID NO: 42; una CDR2 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 10, 23 y 74, y preferiblemente seleccionada de la SEQ ID NO: 23; y una CDR3 de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 11, 24 y 75 y preferiblemente seleccionada de la SEQ ID NO: 11; en el que dichas regiones CDR se seleccionan de modo que el anticuerpo o proteína de la divulgación se una específicamente a IL-17A.

45 En otra realización, un anticuerpo recombinante aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, tiene: una HCDR1' de región variable de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 1; una HCDR2' de región variable de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 2; una HCDR3' de región variable de cadena pesada de acuerdo con la SEQ

ID NO: 3; una LCDR1' de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4, 20, 33, 41 y 71, y preferiblemente seleccionada de la SEQ ID NO: 41; una LCDR2' de región variable de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 5; y una LCDR3' de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 6, 21 y 72, y preferiblemente seleccionada de la SEQ ID NO: 6; en el que dichas regiones CDR se seleccionan de modo que el anticuerpo o proteína de la divulgación se una específicamente a IL-17A.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo comprende la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 3; o SEQ ID NO: 12; o el anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 14.

Como se usa en este documento, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada y ligera o cadenas pesadas y ligeras de longitud completa que son "el producto de" o "derivan de" una secuencia de la línea germinal particular si las regiones variables o cadenas de longitud completa del anticuerpo se obtienen de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Dichos sistemas incluyen inmunizar un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o cribar una genoteca de inmunoglobulinas humanas expresadas en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana puede identificarse tal cual comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de la línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana que está más cercana en secuencia (es decir, el % de identidad más alto) con la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "deriva de" una secuencia de la línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la línea germinal debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas de origen natural o introducción intencionada de mutación dirigida al sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado típicamente es al menos un 90 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana y contiene restos aminoacídicos que identifica el anticuerpo humano como humano en comparación con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de la línea germinal murina). En determinados casos, un anticuerpo humano puede ser al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o al menos un 95 %, o incluso al menos un 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de la línea germinal humana particular presentará no más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En determinados casos, el anticuerpo humano puede tener no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencias de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

En la presente divulgación, se ha identificado un epítipo en IL-17A que es particularmente preferido como diana para la unión de anticuerpos potencialmente terapéuticos. A este epítipo se une XAB1, y los anticuerpos variantes XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 que se han desarrollado por modificación de la secuencia de XAB1. Este epítipo se encuentra en la secuencia de IL-17A, entre los restos Arg 78 y Trp 90.

Puede considerarse que el epítipo comprende los siguientes restos aminoacídicos muy preferidos de dentro de la IL-17A: Arg 78, Glu 80, Trp 90. Además, también se prefieren los siguientes restos aminoacídicos: Tyr 85, Arg 124. Otros restos aminoacídicos importantes son Pro 82, Ser 87, Val 88. Restos aminoacídicos que contribuyen adicionalmente son Val 45*, Leu 49, Asp 81, Glu 83, Pro 86, Pro 130, Phe 133, Lys 137*, donde los aminoácidos marcados con (*) indican resto aportado por la segunda subunidad de IL-17A del homodímero de IL-17A.

Se ha demostrado que los anticuerpos que abordan este epítipo en IL-17A bloquean la unión de IL-17A a su receptor para inhibir los efectos mediados por IL-17A *in vitro*, y para reducir la gravedad de un modelo *in vivo* de reumatismo articular experimental inducido por antígeno. Además, se ha demostrado inesperadamente que los anticuerpos que se unen a este epítipo inhiben los efectos *in vitro* mediados por el heterodímero IL-17AF, y también retienen una afinidad inesperadamente alta por IL-17A y IL-17AF derivadas de variaciones de ratón y otras especies de la molécula diana.

Por tanto, este epítipo es especialmente preferido ya que también se conserva inesperadamente en un formato accesible dentro de la estructura del heterodímero IL-17AF. Por consiguiente, los anticuerpos preferidos de la divulgación también se unirán a heterodímeros IL-17AF. Sin el deseo de limitarse a teoría particular alguna, se espera que la estructura del heterodímero IL-17AF sea suficientemente similar a IL-17A, o que la interacción con los anticuerpos de la divulgación haga que sea suficientemente similar a IL-17A, para que aún se produzca la unión.

Esto es inesperado porque los análisis estructurales basados en las estructuras disponibles para IL-17A, IL-17F y las interacciones entre estas moléculas y anticuerpos o receptores que se han obtenido por cristalografía de rayos X (publicado en la técnica y realizado por los autores de la invención) en combinación con predicciones *in silico*, sugirieron que la unión a, o la reactividad cruzada de los anticuerpos de la divulgación con IL-17AF no se produciría necesariamente. Más específicamente, se predijo que la región del extremo N de la subunidad monomérica IL-17F

del heterodímero impediría estéricamente la unión de anticuerpos de la divulgación al heterodímero IL-17AF. La previsión era, por tanto, que no hubiera reactividad cruzada significativa para los anticuerpos con IL-17AF.

Sin embargo, a pesar de estas predicciones, se ha determinado que la unión cruzada a IL-17AF por los anticuerpos divulgados se produce. Esto puede ser ventajoso, de hecho, por varias razones. Como se analiza anteriormente, IL-17AF también está implicada como citocina proinflamatoria y puede estar implicada en muchas de las mismas afecciones patológicas o eventos biológicos indeseados descritos o sospechosos para IL-17A. Los anticuerpos de la divulgación, por lo tanto, pueden ser especialmente valiosos terapéuticamente porque pueden abordar o interferir tanto con IL-17A como con IL-17AF.

Además, los autores de la presente invención han demostrado que esta unión entre los anticuerpos de la divulgación e IL-17AF también se correlaciona con una inhibición de la actividad biológica de IL-17AF como se observa en ensayos *in vitro*. Por consiguiente, los anticuerpos de la divulgación no solamente abordan de forma eficaz y antagonizan/neutralizan la actividad de IL-17A, sino además la actividad de IL-17AF también.

Una consecuencia inesperada adicional del trabajo realizado por los autores de la presente invención es la siguiente. La maduración de la afinidad del anticuerpo "precursor" original XAB1 también ha producido un conjunto de anticuerpos que retienen una alta afinidad, o una afinidad mejorada por variantes de IL-17A derivadas de otras especies tales como macaco cangrejero, macaco de la India, títí, rata o ratón.

Por tanto, es inesperado porque en el esfuerzo por mejorar la afinidad de los anticuerpos de la divulgación por IL-17A humana no se esperaría mejorar también la afinidad de los anticuerpos resultantes por variantes de especie de IL-17A. De hecho, normalmente se podría esperar lo opuesto. Los esfuerzos por mejorar la afinidad por una variante de especie específica (es decir, humana) de un antígeno diana habitualmente se esperaría que redujera la afinidad por otras variantes de especie de ese antígeno. El concepto de la variante de especie (u homólogo/parólogo) reconoce una ascendencia común para una especie dada, pero acepta que ha tenido lugar divergencia durante el transcurso de la historia evolutiva. Por consiguiente, incluso cuando hay un buen grado de conservación de secuencia entre variantes de una molécula particular que se han identificado en diferentes especies, no puede asumirse que una afinidad mejorada por una variante de especie tendrá una mejora en la afinidad por otra variante de especie. De hecho, la divergencia entre las secuencias para diferentes especies generalmente da lugar a la suposición de que la mejora en la afinidad por una variante más probablemente dará lugar a una reducción (o incluso anulación) de la afinidad de unión por otra variante de especie. La identidad de secuencia entre IL-17A de ratón y humana es únicamente de un 62 % (Moseley *et al.* 2003, Cytokine & Growth Factor Reviews 14:155-174).

Sin embargo, en el presente caso, esto no se observó y las variantes de anticuerpo generadas por los autores de la invención retenían alta afinidad por variantes de IL-17A de otras especies. Esto es útil porque durante el trabajo necesario para desarrollar una molécula de anticuerpo candidata como molécula terapéutica útil, puede requerirse la realización de una diversidad de pruebas y ensayos en otras especies o en células, moléculas o sistemas que comprenden componentes de, o derivados de otras especies (tal como macaco cangrejero, macaco de la India, títí, rata o ratón). Esto hace que los anticuerpos de la divulgación sean especialmente adecuados para desarrollo adicional.

Por consiguiente, los anticuerpos y partes de unión a antígeno de los mismos divulgados en este documento pueden compartir una serie de propiedades deseables, incluyendo alta afinidad por IL-17A, reactividad cruzada con IL-17A de otra especie tal como ratón, rata, macaco cangrejero y títí, ausencia de reactividad cruzada con otros isotipos de IL-17 tales como IL-17F, ausencia de reactividad cruzada con otras citocinas (tales como citocinas humanas o de ratón), reactividad cruzada con IL-17AF heterodimérica, la capacidad de bloquear la unión de IL-17A a su receptor tal como IL-17RA, la capacidad de inhibir o neutralizar los efectos biológicos inducidos por IL-17A tales como la estimulación de secreción de IL-6 o GRO-alfa, y/o la capacidad de inhibir los efectos *in vivo* mediados por IL-17A (y/o IL-17AF) tal como la inflamación que se observa en modelos de reumatismo articular inducido por antígeno.

Los anticuerpos y partes de unión a antígeno de los mismos divulgados en este documento también han demostrado proporcionar una lenta eliminación del complejo de anticuerpo-IL17A, una renovación lenta del ligando y una larga duración de captura de IL17A. Se proporcionan características ventajosas adicionales de estos anticuerpos y proteínas en las realizaciones detalladas.

Anticuerpos homólogos

En otra realización más, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo como se divulga en este documento tiene secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de longitud completa; secuencias de nucleótidos de cadena pesada y ligera de longitud completa, secuencias de nucleótidos de cadena pesada y ligera de región variable o secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera de región variable, o secuencias de aminoácidos o nucleótidos de los anticuerpos XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 descritas anteriormente, en particular en la tabla 1, y en el que los anticuerpos o proteínas de la divulgación retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 originales.

Las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 original pueden seleccionarse del grupo que consiste en:

- 5 (i) afinidad de unión por IL-17A (unión específica a IL-17A), por ejemplo, una K_D que es de 1 nM o menos, 100 pM o menos, o 10 pM o menos, medida en el ensayo Biacore™, por ejemplo, como se describe en los ejemplos;
- (ii) inhibición competitiva de la unión de IL-17R a IL-17A, por ejemplo, una CI_{50} que es de 10 nM o menos, o 1 nM o menos, o 100 pM o menos, medida en un ensayo de unión competitiva *in vitro*, por ejemplo, como se describe en los ejemplos;
- 10 (iii) inhibición de la actividad dependiente de IL-17A, por ejemplo, producción de IL-6 o GRO-alfa, por ejemplo, una CI_{50} que es de 10 nM o menos, o 1 nM o menos, o 100 pM o menos, medida en un ensayo celular como se describe en los ejemplos;
- (iv) inhibición de los efectos observados, por ejemplo, inflamación de la rodilla, medida en un ensayo de reumatismo articular inducido por antígeno *in vivo* como se describe en los ejemplos;
- 15 (v) reactividad cruzada con polipéptido de IL-17A de macaco cangrejero, macaco de la India, rata o ratón;
- (vi) reactividad cruzada con polipéptido de IL-17AF humano o de ratón;
- (vii) afinidad de unión por IL-17AF (unión específica a IL-17AF), por ejemplo, una K_D que es de 1 nM o menos, 100 pM o menos, o 10 pM o menos, medida en el ensayo Biacore™, por ejemplo, como se describe en los ejemplos;
- 20 (viii) inhibición de IL-17AF, por ejemplo, una CI_{50} que es de 200 nM o menos, 150 nM o menos, o 100 nM o menos, medida en un ensayo de unión competitiva *in vitro* como se describe en los ejemplos;
- (ix) propiedades adecuadas para desarrollo de fármacos, en particular, es estable y no se agrega en una formulación a alta concentración, es decir, por encima de 50 mg/ml.

25 Por ejemplo, la divulgación se refiere a anticuerpos homólogos de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 (o una parte de unión a antígeno del mismo), que comprenden secuencias de una cadena pesada variable (V_H) y una cadena ligera variable (V_L) donde las secuencias de CDR, es decir, las 6 regiones CDR; HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3 o HCDR1', HCDR2', HCDR3', LCDR1', LCDR2', LCDR3', comparten al menos un 60, 70, 90, 95 o 100 por ciento de identidad de secuencia con las correspondientes secuencias de CDR de al menos un anticuerpo de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5, en los que dicho anticuerpo homólogo o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como una parte de unión a antígeno del mismo, se une específicamente a IL-17A, y el anticuerpo o proteína muestra al menos una de las siguientes propiedades funcionales: inhibe la unión de IL-17A a sus receptores, inhibe la producción de IL-6 o GRO-alfa dependiente de IL-17A en ensayos celulares, o inhibición de los efectos observados en un ensayo de reumatismo articular inducido por antígeno *in vivo*. En una realización específica relacionada, el anticuerpo homólogo o proteína se une a IL-17A con una K_D de 1 nM o menos e inhibe la unión de IL-17A a sus receptores, medido en un ensayo de unión competitiva *in vitro* con una CI_{50} de 1 nM o menos. Las CDR de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 se definen en la anterior tabla 5 y tabla 6.

40 La divulgación se refiere además a anticuerpos homólogos de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tal como una parte de unión a antígeno de los mismos) que comprenden una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que son al menos un 80 %, 90 % o al menos un 95 % o un 100 % idénticas a las correspondientes regiones variables de cadena pesada y ligera de uno cualquiera de los anticuerpos XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5; el anticuerpo homólogo o proteína se une específicamente a IL-17A, y muestra al menos una de las siguientes propiedades funcionales: inhibe la unión de IL-17A a su o sus receptores, inhibe la producción de IL-6 o GRO-alfa dependiente de IL-17A en ensayos celulares, o inhibición de los efectos observados en un ensayo de reumatismo articular inducido por antígeno *in vivo*. En una realización específica relacionada, el anticuerpo homólogo o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como una parte de unión a antígeno del mismo se une a IL-17A con una K_D de 1 nM o menos e inhibe la unión de IL-17A a su o sus receptores, medido en un ensayo de unión competitiva *in vitro* con una CI_{50} de 1 nM o menos. Las secuencias de aminoácidos de V_H y V_L de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 se definen en la anterior tabla 2.

En otro ejemplo, la divulgación se refiere a anticuerpos homólogos de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tal como una parte de unión a antígeno de los mismos) que comprenden una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa, en los que: la cadena pesada variable está codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o un 100 % idéntica a la correspondiente secuencia de nucleótidos codificante de las cadenas pesada y ligera variables de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5, el anticuerpo homólogo o fragmentos de unión a antígeno del mismo, tal como una parte de unión a antígeno del mismo, se une específicamente a IL-17A, y muestra al menos una de las siguientes propiedades funcionales: inhibe la unión de IL-17A a su o sus receptores, inhibe la producción de IL-6 o GRO-alfa dependiente de IL-17A en ensayos celulares, o inhibición de los efectos observados en un ensayo de reumatismo articular inducido por antígeno *in vivo*. En una realización específica relacionada, el anticuerpo homólogo o fragmentos de unión a antígeno del mismo, tal como una parte de unión a antígeno del mismo se une a IL-17A con una K_D de 1 nM o menos e inhibe la unión a IL-17A, medido en un ensayo de unión competitiva *in vitro* con una CI_{50} de 1 nM o menos. Las secuencias de nucleótidos codificantes de las regiones variables de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5

pueden obtenerse de la tabla 3 que muestra las secuencias de nucleótidos codificantes de longitud completa de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 y la tabla 2 que muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5.

5 En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como una parte de unión a antígeno de un anticuerpo, puede mostrar una o más, dos o más, tres o más, o cuatro o más de las propiedades funcionales deseadas analizadas anteriormente. El anticuerpo o proteína de la divulgación puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. En una realización, el anticuerpo o proteína es un anticuerpo inactivado completamente humano, tal como un anticuerpo IgG1 inactivado completamente humano.

10 Las funciones efectoras inactivadas pueden obtenerse por mutación en la parte constante Fc de los anticuerpos y se han descrito en la técnica: Strohl 2009 (LALA y N297A); Baudino 2008, D265A (Baudino *et al.* 2008, J. Immunol. 181:6664-69, Strohl, CO 2009, Biotechnology 20:685-91). Ejemplos de anticuerpos IgG1 inactivados comprenden el llamado mutante LALA que comprende la mutación L234A y L235A en la secuencia de aminoácidos de Fc de IgG1. Otro ejemplo de un anticuerpo IgG1 inactivado comprende la mutación D265A. La mutación D265A también puede combinarse preferiblemente con la mutación P329A (DAPA). Otro anticuerpo IgG1 inactivado comprende la mutación N297A, que produce anticuerpos aglucosilados o no glucosilados.

15 Los anticuerpos con secuencias de aminoácidos mutantes pueden obtenerse por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de las moléculas de ácido nucleico codificantes, seguida de ensayo del anticuerpo alterado codificado respecto a la función retenida (es decir, las funciones expuestas anteriormente) usando los ensayos funcionales descritos en este documento.

Anticuerpos con modificaciones conservativas

25 En determinadas realizaciones, un anticuerpo (o una parte de unión a antígeno del mismo) de la divulgación tiene una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 (o HCDR1', HCDR2' y HCDR3') y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 (o LCDR1', LCDR2' y LCDR3'), en el que una o más de estas secuencias de CDR tienen secuencias de aminoácidos especificadas basadas en los anticuerpos XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5 descritos en este documento o modificaciones conservativas de las mismas, y en el que el anticuerpo o proteína retiene las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-IL-17A de la divulgación.

30 Como se usa en este documento, la expresión "modificaciones conservativas de secuencia" pretende hacer referencia a sustituciones de aminoácido en que el resto aminoacídico se reemplaza con un resto aminoacídico que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de restos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales con ramificaciones beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, uno o más restos aminoacídicos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la divulgación pueden reemplazarse con otros restos aminoacídicos de la misma familia de cadenas laterales, y el anticuerpo alterado puede ensayarse respecto a la función retenida usando los ensayos funcionales descritos en este documento.

Pueden introducirse modificaciones en un anticuerpo como se divulga en este documento por técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR.

Anticuerpos genomanipulados y modificados

50 Otros anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden prepararse usando un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias de V_H y/o V_L de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5 mostradas anteriormente como material de partida para genomanipular un anticuerpo modificado, que es un anticuerpo modificado que puede tener propiedades alteradas respecto al anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede genomanipularse modificando uno o más restos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo, dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones flanqueantes. Adicionalmente o como alternativa, un anticuerpo se puede genomanipular modificando restos dentro de la región o regiones constantes, por ejemplo, para alterar la función o funciones efectoras del anticuerpo.

60 Un tipo de genomanipulación de región variable que puede realizarse es injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de restos aminoacídicos que están ubicados en las secuencias regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Como las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de interacciones de anticuerpo-antígeno, es posible

expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de anticuerpos de origen natural específicos construyendo vectores de expresión que incluyan secuencias de CDR del anticuerpo de origen natural específico injertadas en secuencias flanqueantes de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.* 1998, Nature 332:323-327; Jones, P. *et al.* 1986, Nature 321:522-525; Queen, C. *et al.* 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; patente de Estados Unidos n.º 5225539 de Winter, y patentes de Estados Unidos n.º 5530101; 5585089; 5693762 y 6180370 de Queen *et al.*)

Por consiguiente, otra realización de la divulgación se refiere a un anticuerpo anti-IL-17A recombinante con CDR injertadas aislado, que comprende las 6 regiones CDR de uno cualquiera de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5 como se define en la tabla 5 o tabla 6, pero que contiene diferentes secuencias flanqueantes de los anticuerpos originales.

Dichas secuencias flanqueantes se pueden obtener de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de la línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para los genes de las regiones variables de cadena pesada y ligera humana pueden encontrarse en la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "VBase" (disponible en Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat, E. A., *et al.* 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación NIH n.º 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* 1992, J. Mol. Biol. 227:776-798; y Cox, J. P. L. *et al.* 1994, Eur. J Immunol. 24:827-836.

Ejemplos de secuencias flanqueantes son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias flanqueantes usadas en uno cualquiera de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5. Las secuencias de CDR1, 2 y 3 de V_H, y las secuencias de CDR1, 2 y 3 de V_L, pueden injertarse en regiones flanqueantes que tiene la secuencia idéntica a la encontrada en el gen de inmunoglobulina de la línea germinal del que deriva la secuencia flanqueante, o las secuencias de CDR pueden injertarse en regiones flanqueantes que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha descubierto que, en determinados casos, es beneficioso mutar restos dentro de las regiones flanqueantes para mantener o potenciar la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5530101; 5585089; 5693762 y 6180370 de Queen *et al.*)

Otro tipo de modificación de la región variable es mutar restos aminoácidos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de V_H y/o V_L para mejorar de ese modo una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés, conocido como "maduración de la afinidad". Se puede realizar mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR para introducir la mutación o mutaciones, y el efecto sobre la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, se puede evaluar en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe en este documento y se proporciona en los ejemplos. Por lo tanto, en una realización, la divulgación se refiere a anticuerpos con afinidad madurada derivados de uno de los anticuerpos XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5. Se pueden introducir modificaciones conservativas (como se analiza anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos. Además, habitualmente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco restos dentro de una región CDR. Por ejemplo, un anticuerpo de la divulgación es un anticuerpo de afinidad madurada que comprende las 6 CDR de uno de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5 y en el que se altera no más de uno, dos, tres, cuatro o cinco restos dentro de una región CDR.

Por consiguiente, en otra realización, la divulgación proporciona anticuerpos anti-IL-17A genomanipulados aislados que comprenden una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que son idénticas a las correspondientes regiones variables de cadena pesada y ligera de al menos uno de los anticuerpos XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5, excepto porque las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y/o ligera de dichos anticuerpos genomanipulados contienen una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácido en comparación con las secuencias originales.

50 **Injerto de dominios de unión a antígeno en estructuras o armazones alternativos**

Puede emplearse una amplia diversidad de estructuras o armazones de anticuerpo/inmunoglobulina siempre que el polipéptido resultante incluya al menos una región de unión de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5, que se una específicamente a IL-17A. Dichas estructuras o armazones incluyen los 5 idiotipos principales de inmunoglobulinas humanas, o fragmentos de las mismas (tales como los divulgados en otra parte en este documento), e incluyen inmunoglobulinas de otras especies animales, preferiblemente que tienen aspectos humanizados. Los anticuerpos de una sola cadena pesada, tales como los identificados en camélidos, son de particular interés a este respecto. Los expertos en la materia siguen descubriendo y desarrollando nuevas estructuras, armazones y fragmentos.

En un aspecto, la divulgación se refiere a la generación de anticuerpos no basados en inmunoglobulina o partes de unión a antígeno de los mismos, usando armazones que no son de inmunoglobulina en los que pueden injertarse las CDR de la divulgación. Pueden emplearse estructuras y armazones que no son de inmunoglobulina conocidos o futuros, siempre que comprendan una región de unión específica para la proteína diana de la SEQ ID NO: 76. Dichos compuestos se denominan en este documento "polipéptidos que comprenden una región de unión específica de

diana". Se describen adicionalmente ejemplos de estructuras que no son de inmunoglobulina en las secciones siguientes (anticuerpos de camélidos y armazón que no es de anticuerpo).

Anticuerpos de camélidos

5 Las proteínas de anticuerpo obtenidas de miembros de la familia de los camellos y dromedarios (*Camelus bactrianus* y *Camelus dromaderius*), incluyendo miembros del Nuevo Mundo tales como especies de llamas (*Lama paccos*, *Lama glama* y *Lama vicugna*) se han caracterizado con respecto al tamaño, la complejidad estructural y la antigenicidad para sujetos humanos. Determinados anticuerpos IgG de esta familia de mamíferos que se encuentran en la naturaleza carecen de cadenas ligeras y, por tanto, son estructuralmente distintos de la estructura cuaternaria típica de cuatro cadenas que tiene dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, para anticuerpos de otros animales. Véase la publicación PCT n.º WO 94/04678.

15 Una región del anticuerpo de camélidos que es el dominio variable único pequeño identificado como V_{HH} puede obtenerse por genomanipulación producir una proteína pequeña que tenga alta afinidad por una diana, produciendo una proteína derivada de anticuerpo de bajo peso molecular conocida como "nanocuerpo de camélido". Véase la patente de Estados Unidos n.º 5759808 presentada el 2 de junio 1998; véase también Stijlemans, B. *et al.* 2004, J Biol Chem 279: 1256-1261; Dumoulin, M. *et al.* 2003, Nature 424: 783-788; Pleschberger, M. *et al.* 2003, Bioconjugate Chem 14: 440-448; Cortez-Retamozo, V. *et al.* 2002, Int J Cancer 89: 456-62; y Lauwereys, M. *et al.* 1998, EMBO J 17: 3512-3520. Hay colecciones de anticuerpos de camélidos genomanipulados y fragmentos de anticuerpos disponibles en el mercado, por ejemplo, en Ablynx, Gante, Bélgica. Como con otros anticuerpos de origen no humano, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de camélido puede alterarse de forma recombinante para obtener una secuencia que se parezca más a una secuencia humana, es decir, el nanocuerpo puede "humanizarse". Por tanto, la baja antigenicidad natural de los anticuerpos de camélido para seres humanos se puede reducir aún más.

25 El nanocuerpo de camélido tiene un peso molecular de aproximadamente una décima parte de una molécula de IgG humana y la proteína tiene un diámetro físico de únicamente unos pocos nanómetros. Una consecuencia del pequeño tamaño es la capacidad de los nanocuerpos de camélido de unirse a sitios antigénicos que sean funcionalmente invisibles a proteínas de anticuerpo más grandes, es decir, los nanocuerpos de camélido son útiles como reactivos que detectan antígenos que de lo contrario serían crípticos usando técnicas inmunológicas clásicas, y como posibles agentes terapéuticos. Por tanto, otra consecuencia más del pequeño tamaño es que un nanocuerpo de camélido puede inhibir como resultado de la unión a un sitio específico en un surco o hendidura estrecha de una proteína diana y, por tanto, puede ejercer una habilidad que se asemeja más a la función de un fármaco clásico de bajo peso molecular que a la de un anticuerpo clásico.

35 El bajo peso molecular y el tamaño compacto provocan además que los nanocuerpos de camélido sean extremadamente termoestables, estables a pH extremo y a digestión proteolítica, y poco antigénicos. Otra consecuencia es que los nanocuerpos de camélido se mueven fácilmente desde el sistema circulatorio a los tejidos e incluso cruzan la barrera hematoencefálica y pueden tratar trastornos que afectan al tejido nervioso. Los nanocuerpos pueden facilitar aún más el transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica. Véase la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20040161738 publicada el 19 de agosto de 2004. Estas características combinadas con la baja antigenicidad para los seres humanos indican un gran potencial terapéutico. Además, estas moléculas pueden expresarse completamente en células procariontas tales como *E. coli* y se expresan como proteínas de fusión en bacteriófagos y son funcionales.

45 Los nanocuerpos genomanipulados pueden adaptarse adicionalmente por genomanipulación para obtener una semivida en un sujeto destinatario de 45 minutos a dos semanas. En una realización específica, el anticuerpo o nanocuerpo de camélido se obtiene injertando las secuencias de las CDR de la cadena pesada o ligera de uno de los anticuerpos humanos de la divulgación, XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5, en secuencias flanqueantes del nanocuerpo o anticuerpo de un solo dominio, como se describen, por ejemplo, en la publicación PCT n.º WO 94/04678.

Armazón que no es de anticuerpo

55 Las estructuras o armazones que no son de inmunoglobulina conocidos incluyen, aunque sin limitación, Adnectinas (fibronectina) (Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA), anquirina (Molecular Partners AG, Zurich, Suiza), anticuerpos de dominio (Domantis, Ltd (Cambridge, MA) y Ablynx nv (Zwijnaarde, Bélgica)), lipocalina (Anticalina) (Pieris Proteolab AG, Freising, Alemania), inmunofármacos modulares pequeños (Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA), maxicuerpos (Avidia, Inc. (Mountain View, CA)), Proteína A (Affibody AG, Suecia) y afilina (cristalina gamma o ubicuitina) (Scil Proteins GmbH, Halle, Alemania), miméticos de epítopos proteínicos (Polyphor Ltd, Allschwil, Suiza).

(a) Armazón de fibronectina

65 Los armazones de fibronectina se basan preferiblemente en el dominio de fibronectina de tipo III (por ejemplo, el décimo módulo de la fibronectina de tipo III (dominio Fn3 10)). El dominio de fibronectina de tipo III tiene 7 u 8 cadenas

beta que están distribuidas entre dos láminas beta, que se empaquetan entre sí para formar el núcleo de la proteína, y además contienen bucles (análogos a las CDR) que conectan las cadenas beta entre sí y están expuestos a los disolventes. Hay al menos tres de dichos bucles en cada borde del emparedado de láminas beta, donde el borde es el límite de la proteína perpendicular a la dirección de las cadenas beta (patente de Estados Unidos n.º 6818418).

5 Estos armazones basados en fibronectina no son una inmunoglobulina, aunque el plegamiento general está estrechamente relacionado con el del fragmento de anticuerpo funcional más pequeño, la región variable de la cadena pesada, que comprende la unidad de reconocimiento del antígeno completa en IgG de camello y llama. Debido a esta estructura, el anticuerpo que no es de inmunoglobulina imita propiedades de unión al antígeno que son similares en naturaleza y afinidad a las de los anticuerpos. Estos armazones pueden usarse en una estrategia de aleatorización y reordenamiento de bucles *in vitro* que es similar al proceso de maduración de la afinidad de los anticuerpos *in vivo*. Estas moléculas basadas en fibronectina pueden usarse como armazones donde las regiones de bucle de la molécula pueden remplazarse con CDR de uno de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5 usando técnicas de clonación convencionales.

15 **(b) Anquirina - Molecular Partners**

La tecnología se basa en el uso de proteínas con módulos de repetición derivados anquirina como armazones para que mantengan regiones variables que puedan usarse para la unión a diferentes dianas. El módulo de repetición de anquirina es un polipéptido de 33 aminoácidos que consiste en dos hélices α antiparalelas y un giro β . La unión de las regiones variables se optimiza principalmente mediante el uso de expresión en ribosomas.

20 **(c) Maxicuerpos/avímeros - Avidia**

25 Los avímeros derivan de proteína natural que contiene dominio A tal como LRP-1. Estos dominios se usan por naturaleza para las interacciones proteína-proteína y en seres humanos más de 250 proteínas se basan estructuralmente en dominios A. Los avímeros consisten en varios monómeros diferentes de "dominio A" (2-10) unidos mediante conectores de aminoácidos. Pueden crearse avímeros que puedan unirse al antígeno diana usando la metodología descrita en, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 20040175756; 20050053973; 20050048512; y 20060008844.

30 **(d) Proteína A - Affibody**

Los ligandos de afinidad Affibody® son proteínas simples y pequeñas compuestas de un haz de tres hélices basado en el armazón de uno de los dominios de unión a IgG de Proteína A. La Proteína A es una proteína superficial de la bacteria *Staphylococcus aureus*. Este dominio de armazón consiste en 58 aminoácidos, de los que 13 se aleatorizan para generar colecciones Affibody® con una gran cantidad de variantes de ligando (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5831012). Las moléculas Affibody® imitan a los anticuerpos; tienen un peso molecular de 6 kDa, en comparación con el peso molecular de los anticuerpos, que es de 150 kDa. A pesar de su pequeño tamaño, el sitio de unión de moléculas Affibody® es similar al de un anticuerpo.

35 **(e) Anticalinas - Pieris**

Las Anticalin® son productos desarrollados por la empresa Pieris ProteoLab AG. Derivan de las lipocalinas, un grupo extenso de proteínas pequeñas y robustas que habitualmente están implicadas en el transporte o almacenamiento fisiológico de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Varias lipocalinas naturales se encuentran en tejidos humanos o líquidos corporales.

La arquitectura de la proteína recuerda a las inmunoglobulinas, con bucles hipervariables en la parte superior de una estructura rígida. Sin embargo, en contraste con los anticuerpos o sus fragmentos recombinantes, las lipocalinas están compuestas por una sola cadena polipeptídica con 160 a 180 restos aminoacídicos, que son ligeramente más grandes que un solo dominio de inmunoglobulina.

El conjunto de cuatro bucles, que constituye el bolsillo de unión, muestra una plasticidad estructural pronunciada y tolera una diversidad de cadenas laterales. Por tanto, el sitio de unión se puede remodelar en un proceso patentado para que reconozca moléculas diana indicadas de diferente forma, con alta afinidad y especificidad.

Se ha usado una proteína de la familia de las lipocalinas, la proteína de unión a bilina (BBP) de *Pieris brassicae*, para desarrollar anticalinas por mutagénesis del conjunto de cuatro bucles. Un ejemplo de una solicitud de patente que describe "anticalinas" es la publicación PCT WO 199916873.

40 **(f) Afilina - Scil Proteins**

Las moléculas Afilin™ son proteínas pequeñas que no son inmunoglobulinas que se diseñan para afinidades específicas hacia proteínas y moléculas pequeñas. Las nuevas moléculas Afilin™ pueden seleccionarse muy

rápidamente de dos colecciones, cada una de ellas basada en una proteína de armazón diferente derivada de seres humanos.

5 Las moléculas Affilin™ no muestran ninguna homología estructural con las proteínas de inmunoglobulina. Scil Proteins emplea dos armazones de Affilin™, uno de ellos es cristalina gamma, una proteína estructural humana del cristalino del ojo y el otro es de proteínas de la superfamilia de la "ubiquitina". Ambos armazones humanos son muy pequeños, muestran estabilidad a altas temperaturas y son casi resistentes a los cambios de pH y agentes desnaturizantes. Esta alta estabilidad se debe principalmente a la estructura de lámina beta expandida de las proteínas. En el documento WO200104144 se describen ejemplos de proteínas derivadas de la cristalina gamma y en el documento
10 WO2004106368 se describen ejemplos de proteínas "de tipo ubiquitina".

(g) Miméticos de epítomos proteínicos (PEM)

15 Los PEM son moléculas de tipo peptídico cíclicas de tamaño medio (PM 1-2 kDa) que imitan las estructuras secuencias de horquilla beta de proteínas, la estructura secundaria principal implicada en las interacciones entre proteínas.

Genomanipulación de la región flanqueante o de Fc

20 Los anticuerpos genomanipulados y partes de unión a antígeno de los mismos de la divulgación incluyen aquellos en que se han hecho modificaciones a los restos flanqueantes dentro de V_H y/o V_L, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, dichas modificaciones de la región flanqueante se realizan para disminuir la inmunogenia del anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia es "retromutar" uno o más restos flanqueantes a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha experimentado mutación somática puede contener restos flanqueantes que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que deriva el anticuerpo.
25 Dichos restos se pueden identificar comparando las secuencias flanqueantes del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de las que deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región flanqueante a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas pueden "retromutarse" a la secuencia de la línea germinal por, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis mediada por PCR. También se pretende que dichos anticuerpos "retromutados" estén englobados por la divulgación.

30 Otro tipo de modificación en la región flanqueante implica mutar uno o más restos dentro de la región flanqueante, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar los epítomos de linfocitos T para reducir de ese modo la inmunogenia potencial del anticuerpo. Esta estrategia también se denomina "desinmunización" y se describe en mayor detalle en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20030153043 de Carr *et al.*

35 Además o como alternativa a las modificaciones hechas dentro de las regiones flanqueantes o CDR, los anticuerpos de la divulgación pueden genomanipularse para que incluyan modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor de Fc y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la divulgación puede modificarse químicamente (por ejemplo, pueden adherirse uno o más restos químicos al anticuerpo) o modificarse para alterar su glucosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación.

45 Como se usa en este documento, la expresión "región Fc" se usa para definir la región del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo la región Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. La región Fc de cadena pesada de IgG humana en general se define comprendiendo el resto aminoacídico desde la posición C226 o desde P230 hasta el extremo carboxílico del anticuerpo IgG. La numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU de Kabat. La lisina del extremo C (resto K447) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos de la divulgación puede
50 comprender poblaciones de anticuerpos con todos los restos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin los restos K447 eliminados, y poblaciones de anticuerpos que tienen una mezcla de anticuerpos con y sin el resto K447.

En una realización, la región de bisagra de CH1 se modifica de modo que el número de restos de cisteína en la región de bisagra se altere, por ejemplo, se aumente o disminuya. Esta estrategia se describe adicionalmente en la patente de Estados Unidos n.º 5677425 de Bodmer *et al.* El número de restos de cisteína en la región de bisagra de CH1 se altera para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.
55

En otra realización, la región de bisagra de Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácido en la región interfacial del dominio CH2-CH3 del fragmento de Fc-bisagra de modo que el anticuerpo tenga una unión alterada a la proteína A estafilocócica (SpA) con respecto a la unión de SpA al dominio de Fc-bisagra nativo. Esta estrategia se describe en mayor detalle en la patente de Estados Unidos n.º 6165745 de Ward *et al.*
60

En otra realización, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversas estrategias. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6277375 de Ward. Como alternativa, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o CL para que contenga un epítipo de unión a receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 5869046 y 6121022 de Presta *et al.*

En otras realizaciones más, la región Fc se altera reemplazando al menos un resto aminoacídico con un resto aminoacídico diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo. Por ejemplo, se puede reemplazar uno o más aminoácidos con un resto aminoacídico diferente de modo que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector, pero conserve la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo precursor. El ligando efector para el que altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Esta estrategia se describe en mayor detalle en las patentes de Estados Unidos n.º 5624821 y 5648260, ambas de Winter *et al.*

En otra realización, puede reemplazarse uno o más aminoácidos seleccionados de restos aminoacídicos con un resto aminoacídico diferente de modo que el anticuerpo tenga unión alterada a C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o anulada. Esta estrategia se describe en mayor detalle en la patente de Estados Unidos n.º 6194551 de Idusogie *et al.*

En otra realización, se altera uno o más restos aminoacídicos para alterar de ese modo la capacidad del anticuerpo de fijar el complemento. Esta estrategia se describe con más detalle en la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer *et al.*

En otra realización más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor de Fcγ modificando uno o más aminoácidos. Esta estrategia se describe con más detalle en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de unión en IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcγRn se han cartografiado y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields, R.L. *et al.* 2001, J. Biol. Chem 276:6591-6604).

En determinadas realizaciones, se usa el dominio Fc del isotipo IgG1. En algunas realizaciones específicas, se usa una variante mutante del fragmento Fc de IgG1, por ejemplo, un Fc de IgG1 inactiva que reduce o elimina la capacidad del polipéptido de fusión de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o de unirse a un receptor de Fcγ. Un ejemplo de un mutante inactivo del isotipo IgG1 es IgG1 en la que la leucina se reemplaza por alanina en las posiciones de aminoácido 234 y 235 como se describe por Hezareh *et al.* 2001, J. Virol 75:12161-8 Otro ejemplo de un mutante inactivo de isotipo IgG1 es IgG1 con la mutación D265A (que sustituye aspartato por alanina en la posición 265). En determinadas realizaciones, el dominio Fc es un mutante de Fc inactivo que evita la glucosilación en la posición 297 del dominio Fc. Por ejemplo, el dominio Fc contiene una sustitución de aminoácido de asparagina en la posición 297. Un ejemplo de dicha sustitución de aminoácido es el remplazo de N297 por una glicina o una alanina.

En otra realización más, la glucosilación de un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se modifica. Por ejemplo, puede prepararse un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación puede alterarse, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dichas modificaciones glucídicas se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glucosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácido que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glucosilación de la región flanqueante de la región variable para eliminar de ese modo la glucosilación en ese sitio. Dicha aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dicha estrategia se describe en mayor detalle en las patentes de Estados Unidos n.º 5714350 y 6350861 de Co *et al.*

Adicionalmente o como alternativa, puede prepararse un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo que tenga un tipo alterado de glucosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de restos de fucosilo o un anticuerpo que tenga un aumento en las estructuras de GlcNac bisecantes. Se ha demostrado que dichos patrones de glucosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones glucídicas se pueden conseguir, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con una maquinaria de glucosilación alterada. Se han descrito en el técnica células con maquinaria de glucosilación alterada y se pueden usar como células hospedadoras en las que expresar anticuerpos recombinantes de la divulgación para producir de ese modo un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1176195 de Hang *et al.* describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en dicha línea celular muestran hipofucosilación. Por lo tanto, en una realización, los anticuerpos de la divulgación se producen por expresión recombinante en una línea celular que muestra un patrón de hipofucosilación, por ejemplo, una línea celular de mamífero con expresión defectuosa del gen FUT8 que codifica fucosiltransferasa. La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una línea celular CHO

variante, células Lec13, con capacidad reducida de adherir fucosa a glúcidos ligados a Asn(297), lo que también provoca hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, R.L. *et al.* 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La publicación PCT WO 99/54342 de Umana *et al.* describe líneas celulares genomanipuladas para que expresen glucosil transferasas modificadoras de glucoproteína (por ejemplo, beta(1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares genomanipuladas muestran aumento de estructuras de GlcNac bisecantes, que provoca actividad de ADCC aumentada de los anticuerpos (véase también Umana *et al.* 1999, Nat. Biotech. 17:176-180). Como alternativa, los anticuerpos y partes de unión a antígeno de los mismos de la divulgación pueden producirse en una levadura o un hongo filamentoso genomanipulado para que tenga un patrón de glucosilación como el de mamíferos, y que pueda producir anticuerpos que carezcan de fucosa como patrón de glucosilación (véase, por ejemplo, EP 1297172).

Otra modificación de los anticuerpos y partes de unión a antígeno de los mismos como se divulga en este documento que se contempla por la divulgación es la pegilación. Estas moléculas pueden pegilarse, por ejemplo, para aumentar su semivida biológica (por ejemplo, en suero). Por ejemplo, para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como derivado reactivo de éster o aldehído de PEG, en condiciones en que uno o más grupos de PEG quedan adheridos al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La pegilación se puede llevar a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula reactiva de PEG (o un polímero hidrosoluble reactivo análogo). Se pretende que el término "polietilenglicol", como se usa en este documento, englobe cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tal como monoalcoxi(C1-C10)- o ariloxipolietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En determinadas realizaciones, el anticuerpo a pegilar es un anticuerpo aglucosilado. Los métodos para pegilar proteínas son conocidos en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos de la divulgación. Véase, por ejemplo, el documento EP 0154316 de Nishimura *et al.* y el documento EP 0401384 de Ishikawa *et al.*

Otra modificación de los anticuerpos y partes de unión a antígeno de los mismos que se contempla por la divulgación es un conjugado o una proteína de fusión de al menos la región de unión a antígeno del anticuerpo de la divulgación con una proteína sérica, tal como seroalbúmina humana o un fragmento de la misma para aumentar la semivida de la molécula resultante. Dicha estrategia se describe, por ejemplo, en Ballance *et al.* documento EP 0322094.

Otra posibilidad es una fusión de al menos una región de unión a antígeno del anticuerpo de la divulgación a proteínas que pueden unirse a proteínas séricas, tales como seroalbúmina humana para aumentar la semivida de la molécula resultante. Dicha estrategia se describe, por ejemplo, en Nygren *et al.*, documento EP 0486525.

Métodos de genomanipulación de anticuerpos alterados

Como se analiza anteriormente, los anticuerpos anti-IL-17A que tienen secuencias de V_H y V_L o secuencias de cadena pesada y ligera de longitud completa mostradas en este documento pueden usarse para crear nuevos anticuerpos anti-IL-17A modificando las secuencias de cadena pesada y/o cadena ligera de longitud completa, las secuencias de V_H y/o V_L, o la una o más regiones constantes adheridas a las mismas. Por tanto, en otro aspecto de la divulgación, las características estructurales de un anticuerpo anti-IL-17A de la divulgación se usan para crear anticuerpos anti-IL-17A estructuralmente relacionados o partes de unión a antígeno de los mismos que retengan al menos una propiedad funcional de los anticuerpos divulgados en este documento, tal como la unión a IL-17A humana y también la inhibición de una o más propiedades funcionales de IL-17A (por ejemplo, inhibición de la unión de IL-17A o IL-17AF a su o sus receptores, inhibición de la producción de IL-6, GRO-alfa inducida por IL-17A o IL-17AF, etc.) en ensayos *in vivo* de actividad inhibitoria.

Otros anticuerpos que retienen sustancialmente las mismas propiedades de unión a IL-17A incluyen anticuerpos quiméricos o anticuerpos de CDR injertadas de uno cualquiera de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5 que retienen las mismas regiones V_H y V_L, o las regiones CDR, de uno cualquiera de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5 y diferentes regiones constantes o regiones flanqueantes (por ejemplo, una región Fc diferente seleccionada de un isotipo diferente, por ejemplo, IgG4 o IgG2).

Por ejemplo, puede combinarse una o más regiones CDR de uno cualquiera de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5, o mutaciones de las mismas, de forma recombinante con regiones flanqueantes conocidas y/u otras CDR para crear anticuerpos anti-IL-17A genomanipulados de forma recombinante adicionales de la divulgación, como se analiza anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección previa. El material de partida para el método de genomanipulación es una o más de las secuencias de V_H y/o V_L de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5 proporcionadas en las tablas anteriores, o una o más regiones CDR de los mismos. Para crear el anticuerpo genomanipulado, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como proteína) un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias de V_H y/o V_L de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5, o una o más regiones CDR de los mismos. En su lugar, la información contenida en la una o más secuencias se usa como material de partida para crear una o más secuencias de "segunda generación" derivadas de la una o más secuencias originales y luego se prepara la una o más secuencias de "segunda generación" y se expresan como una proteína.

Las secuencias de segunda generación se obtienen, por ejemplo, alterando la secuencia codificante de ADN de al menos un resto aminoacídico dentro de la secuencia del anticuerpo de región variable de cadena pesada y/o la secuencia del anticuerpo de región variable de cadena ligera de uno cualquiera de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5, para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y expresando la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

Por consiguiente, en otra realización, la divulgación proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-IL-17A optimizado para su expresión en una célula de mamífero, que consiste en: una secuencia del anticuerpo de cadena pesada de longitud completa y una secuencia del anticuerpo de cadena ligera de longitud completa de uno cualquiera de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5; alterando al menos un codón en la secuencia codificante de nucleótidos, codificando dicho codón una resto aminoacídico dentro de la secuencia del anticuerpo de cadena pesada de longitud completa y/o la secuencia del anticuerpo de cadena ligera de longitud completa para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

La secuencia de anticuerpo alterada también puede prepararse cribando colecciones de anticuerpos que tienen secuencias de CDR3 únicas de cadena pesada y ligera de uno cualquiera de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5, respectivamente, o determinantes de unión esenciales mínimos como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 20050255552, y secuencias alternativas para las secuencias de CDR1 y CDR2. El cribado se puede realizar de acuerdo con cualquier tecnología de cribado apropiada para cribar anticuerpos de colecciones de anticuerpos, tal como la tecnología de expresión en fagos.

Pueden usarse técnicas convencionales de biología molecular para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada. El anticuerpo codificado por la una o más secuencias de anticuerpo alteradas es uno que retiene una, alguna o todas las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-IL-17A descritos en este documento, cuyas propiedades funcionales incluyen, aunque sin limitación, específicamente la unión a IL-17A humana; y/o que inhibe la unión de IL-17A a su o sus receptores; y/o que inhibe la producción inducida por IL-17A de, por ejemplo, IL-6 o GRO-alfa, etc.

El anticuerpo alterado puede mostrar una o más, dos o más, o tres o más de las propiedades funcionales analizadas anteriormente.

En determinadas realizaciones de los métodos de genomanipulación de anticuerpos de la divulgación, pueden introducirse mutaciones de forma aleatoria o selectiva a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante de anticuerpo anti-IL-17A y los anticuerpos anti-IL-17A modificados resultantes pueden cribarse por su actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se describe en este documento. Se han descrito en el técnica métodos de mutación. Por ejemplo, la publicación PCT WO 02/092780 de Short describe métodos para crear y cribar mutaciones de anticuerpos usando mutagénesis de saturación, ensamblaje por ligamiento sintético o una combinación de los mismos. Como alternativa, la publicación PCT WO 03/074679 de Lazar *et al.* describe métodos de uso de métodos de cribado informatizados para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

Moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos de la divulgación

Otro aspecto de la divulgación se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos o proteínas de la divulgación. Ejemplos de secuencias de nucleótidos de cadena ligera variable son aquellas que codifican las secuencias de aminoácidos de cadena ligera variable de uno cualquiera de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5, derivando las últimas secuencias de la tabla 3 (que muestra las secuencias codificantes de nucleótidos completas de cadenas pesadas y ligeras de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5) y la tabla 2 (que muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5).

La divulgación también se refiere a moléculas de ácido nucleico que derivan de las últimas secuencias que se han optimizado para la expresión de proteínas en células de mamífero, por ejemplo, líneas celulares CHO.

Los ácidos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o pueden ser ácidos nucleicos en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o "se hace sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, por técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/con SDS, bandeado con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica. Véase, F. Ausubel, *et al.*, ed. 1987, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la divulgación puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener secuencias intrónicas o no. En una realización, el ácido nucleico es una molécula de ADNc. El ácido nucleico puede estar presente en un vector tal como un vector de presentación en fago, o en un vector plasmídico recombinante.

Los ácidos nucleicos de la divulgación pueden obtenerse usando técnicas convencionales de biología molecular. Una vez obtenidos fragmentos de ADN que codifican, por ejemplo, segmentos V_H y V_L, estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente por técnicas convencionales de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los genes

de la región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmento Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN codificante de V_L o V_H se une de forma funcional a otra molécula de ADN, o a un fragmento que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un conector flexible. La expresión "unido de forma funcional", como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de una manera funcional, por ejemplo, de modo que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco de lectura, o de modo que la proteína se exprese bajo el control de un promotor deseado.

El ADN aislado que codifica la región V_H puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa uniendo de forma funcional el ADN que codifica V_H a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación NIH n.º 91-3242) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse por amplificación convencional por PCR. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada se selecciona entre isotipos IgG1. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede unirse de forma funcional a otra molécula de ADN que codifica únicamente la región constante CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región V_L puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera de Fab) uniendo de forma funcional el ADN que codifica V_L a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de la región constante de cadena ligera humana son conocidas en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, publicación NIH n.º 91-3242) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse por amplificación convencional por PCR. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o una lambda.

Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L se unen de forma funcional a otro fragmento que codifica un conector flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser)₃, de modo que las secuencias de V_H y V_L puedan expresarse como una proteína monocatenaria contigua, con las regiones V_L y V_H unidas mediante un conector flexible (véase, por ejemplo, Bird *et al.* 1988, Science 242:423-426; Huston *et al.* 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty *et al.* 1990, Nature 348:552-554).

Aislamiento de anticuerpos recombinantes de la divulgación

Se ha descrito una diversidad de métodos de cribado de anticuerpos y partes de unión a antígeno de los mismos en la técnica. Dichos métodos pueden dividirse en sistemas *in vivo*, tales como ratones transgénicos que pueden producir anticuerpos completamente humanos tras inmunización antigénica y sistemas *in vitro*, que consisten en generar colecciones codificantes de ADN de anticuerpos, expresando la colección de ADN en un sistema apropiado para la producción de anticuerpos, seleccionando el clon que expresa el anticuerpo candidato que se une a la diana con los criterios de selección de afinidad y recuperando la secuencia codificante correspondiente del clon seleccionado. Estas tecnologías *in vitro* son conocidas como tecnologías de presentación e incluyen, sin limitación, presentación en fagos, presentación de ARN o ADN, expresión en ribosomas, presentación el levaduras o células de mamífero. Se ha descrito bien en la técnica (para una revisión véase, por ejemplo: Nelson *et al.* 2010, Nature Reviews Drug discovery, "Development trends for human monoclonal antibody therapeutics" (publicación en línea anticipada) y Hoogenboom *et al.* 2001, *Method in Molecular Biology* 178:1-37, O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, N.J.). En una realización específica, los anticuerpos recombinantes humanos de la divulgación se aíslan usando métodos de presentación en fagos para cribar colecciones de colecciones de anticuerpos recombinantes humanos, tales como colecciones HuCAL®.

Los repertorios de genes de V_H y V_L o regiones CDR relacionadas pueden clonarse por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o sintetizarse mediante sintetizador de ADN y recombinarse aleatoriamente en colecciones de fagos, que después pueden cribarse para los clones de unión a antígeno. Dichos métodos de expresión en fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica o se describen en los ejemplos siguientes. Véanse por ejemplo: las patentes de Estados Unidos n.º 5223409; 5403484; y 5571698 de Ladner *et al.*; las patentes de Estados Unidos n.º 5427908 y 5580717 de Dower *et al.*; las patentes de Estados Unidos n.º 5969108 y 6172197 de McCafferty *et al.*; y las patentes de Estados Unidos n.º 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 y 6593081 de Griffiths *et al.*

En una determinada realización, los anticuerpos humanos dirigidos contra IL-17A pueden identificarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que porten partes de sistema inmunitario humano en lugar del sistema murino. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones denominados en este documento ratones HuMAB y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en este documento "ratones de Ig humana".

El ratón HuMAb® (Medarex, Inc.) contiene minilocus de genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y ligera κ humanas no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los locus de cadena μ y κ endógenos (véase, por ejemplo, Lonberg, *et al.* 1994, *Nature* 368:856-859). Por consiguiente, los ratones muestran expresión reducida de IgM de ratón o κ , y en respuesta a inmunización, los transgenes introducidos de cadena pesada y ligera humana experimentan cambios de clase y mutación somática para generar IgGk monoclonal humana de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.* 1994, *supra*; revisado en Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. 1995, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. 1995, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y uso de ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas portadas por dichos ratones, se describen adicionalmente en Taylor, L. *et al.* 1992, *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. *et al.* 1993, *International Immunology* 5:647-656; Tuailleon *et al.* 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3720-3724; Choi *et al.* 1993, *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. *et al.* 1993, *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailleon *et al.* 1994, *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.* 1994, *International Immunology* 5:579-591; y Fishwild, D. *et al.* 1996, *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Véanse además, las patentes de Estados Unidos n.º 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299; y 5770429; todas de Lonberg y Kay; la patente de Estados Unidos n.º 5545807 de Surani *et al.*; las publicaciones PCT n.º WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y la publicación PCT n.º WO 01/14424 de Korman *et al.*

En otra realización, los anticuerpos humanos de la divulgación pueden generarse usando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porta un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Dichos ratones, denominados en este documento "ratones KM", se describen en detalle en la publicación PCT WO 02/43478 de Ishida *et al.*

Además, están disponibles en la técnica sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para generar anticuerpos anti-IL-17A de la divulgación. Por ejemplo, puede usarse un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse de Abgenix, Inc. Dichos ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 y 6162963 de Kucherlapati *et al.* Como apreciarán los expertos en la materia, pueden usarse otros varios modelos de ratón, tal como el ratón Trianni™ de Trianni, Inc., el ratón VelocImmune™ de Regeneron Pharmaceuticals, Inc. o el ratón Kymouse™ de Kymab Limited.

Además, están disponibles en la técnica sistemas de animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para generar anticuerpos anti-IL-17A de la divulgación. Por ejemplo, pueden usarse ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, denominados "ratones TC"; dichos ratones se describen en Tomizuka *et al.* 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación también pueden prepararse usando ratones SCID en que se han reconstituido células inmunitarias humanas de modo que pueda generarse una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Dichos ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5476996 y 5698767 de Wilson *et al.*

Generación de anticuerpos monoclonales de la divulgación a partir del sistema murino

Pueden producirse anticuerpos monoclonales (mAb) mediante una diversidad de técnicas, incluyendo metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica convencional de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein 1975, *Nature* 256:495. Pueden emplearse muchas técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación vírica u oncogénica de linfocitos B.

Un sistema animal para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridoma en ratones es un procedimiento bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión son conocidos en la técnica. Los compañeros de fusión (por ejemplo, células murinas de mieloma) y procedimientos de fusión también son conocidos.

Pueden prepararse anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente divulgación basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se describe anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse del hibridoma murino de interés y genomanipularse para que contenga secuencias de inmunoglobulina no murina (por ejemplo, humana) usando técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden unirse a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4816567 de Cabilly *et al.*). Para crear un anticuerpo humanizado, se pueden insertar regiones CDR murinas en una región flanqueante humana empleando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5225539 de Winter, y las patentes de Estados Unidos n.º 5530101; 5585089; 5693762 y 6180370 de Queen *et al.*

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos

5 Para generar hibridomas que produzcan anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación, pueden aislarse
 10 esplenocitos y/o células de los ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse con una línea celular
 15 inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden cribarse
 20 para la producción de anticuerpos específicos de antígeno o específicos de epítipo. Por ejemplo, pueden fusionarse
 suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con una sexta parte numérica
 de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con un 50 % de PEG. Las células
 se siembran a aproximadamente 2×145 en placas de microvaloración de fondo plano, seguido de una incubación de
 dos semanas en medio selectivo que contiene un 20 % de suero clonal fetal, un 18 % de medio acondicionado "653",
 un 5 % de origen (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50
 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomycin, 50 mg/ml de gentamicina y HAT 1X (Sigma; el HAT se añade
 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden cultivarse en medio
 en que el HAT se reemplaza con HT. Entonces pueden cribarse pocillos individuales por ELISA para anticuerpos IgM
 e IgG monoclonales humanos. Una vez se produce el crecimiento extensivo del hibridoma, puede observarse el medio
 habitualmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpo pueden volver a sembrarse, volver a
 cribarse y, si aún son positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse una o dos veces
 por dilución limitante. Los subclones estables entonces pueden cultivarse *in vitro* para generar cantidades pequeñas
 de anticuerpo en medio de cultivo tisular para caracterización.

25 Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, los hibridomas seleccionados pueden cultivarse en matraces de
 agitación de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y
 concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La IgG
 eluida puede comprobarse por electroforesis en gel y cromatografía de líquidos de alto rendimiento para asegurar la
 pureza. La solución tamponante puede intercambiarse con PBS, y la concentración puede determinarse por DO_{280}
 usando coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en alícuotas y almacenarse
 a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

30 Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la divulgación pueden producirse en un transfectoma de célula hospedadora usando, por ejemplo,
 una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica, que se conoce bien en la
 técnica (por ejemplo, Morrison, S. 1985, Science 229:1202).
 35 Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, pueden obtenerse ADN que
 codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o de longitud completa por técnicas convencionales de biología
 molecular o bioquímica (por ejemplo, síntesis química de ADN, amplificación por PCR o clonación de ADNc usando
 un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADN pueden insertarse en vectores de expresión de modo
 40 que los genes se unan de forma funcional a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto,
 la expresión "unido de forma funcional" pretende significar que un gen de anticuerpo se liga en un vector de modo que
 las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector cumplen su función pretendida de regular
 la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión
 se eligen para que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión usada. El gen de cadena ligera del
 anticuerpo y el gen cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en vectores distintos o, más típicamente, ambos
 45 genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión
 mediante métodos convencionales (por ejemplo, ligamiento de sitios de restricción complementarios en el fragmento
 del gen del anticuerpo y el vector, o ligamiento de extremo romos si no hay presentes sitios de restricción). Las
 regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en este documento pueden usarse para
 crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolas en vectores de
 50 expresión que ya codifican las regiones constantes de cadena pesada y la región constante de cadena ligera del
 isotipo deseado, de modo que el segmento V_H es una de forma funcional al uno o más segmentos C_H dentro del vector
 y el segmento V_L es una de forma funcional al segmento C_L dentro del vector. Adicionalmente o como alternativa, el
 vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal, también llamado secuencia líder, que facilita la
 secreción de la cadena del anticuerpo desde una célula hospedadora. El gen de la cadena del anticuerpo puede
 55 clonarse en el vector de modo que el péptido señal se una en el mismo marco al extremo amino del gen de la cadena
 del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es
 decir, un péptido señal de una proteína que no es inmunoglobulina). Ejemplos de dichos péptidos señal se encuentran
 en la tabla 7, y ejemplos de secuencias polinucleotídicas que codifican los péptidos señal se encuentran en la tabla 8.

60 Tabla 7. Péptidos señal para cadenas peptídicas pesada y ligera.

Péptido señal	Número de identificación de secuencia	Usado para cadena peptídica pesada o ligera
1	SEQ ID NO: 59	Pesada
2	SEQ ID NO: 60	Ligera
3	SEQ ID NO: 63	Pesada

4	SEQ ID NO: 64	Ligera
5	SEQ ID NO: 67	Pesada
6	SEQ ID NO: 68	Ligera

Tabla 8. Secuencias polinucleotídicas que codifican los péptidos señal.

Codifica el péptido señal n.º	Número de identificación de secuencia	Codifica la secuencia de péptido señal para cadena pesada o ligera
1	SEQ ID NO: 61	Pesada
2	SEQ ID NO: 62	Ligera
3	SEQ ID NO: 65	Pesada
4	SEQ ID NO: 66	Ligera
5	SEQ ID NO: 69	Pesada
6	SEQ ID NO: 70	Ligera

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinante de la divulgación portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula hospedadora. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel 1990, Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras para la expresión en células hospedadoras de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus del simio 40 (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Como alternativa, pueden usarse secuencias reguladoras no víricas, tales como el promotor de la ubiquitina o el promotor de P-globina. Además, elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SRa, que contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia de linfocitos T humanos de tipo 1 (Takebe, Y. *et al.* 1988, Mol. Cell. Biol. 8:466-472).

Además de los genes de cadena del anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la divulgación pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de células hospedadoras en que el vector se ha introducido (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 4399216, 4634665 y 5179017, todas de Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente, el gen marcador de selección confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en que se ha introducido el vector. Los genes marcadores de selección incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr- con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para selección con G418).

Para la expresión de las cadenas pesada y ligera, se aplicaron técnicas convencionales para transfectar una célula hospedadora con el uno o más vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera.

Se pretende que las diversas formas del término "transfección" engloben una amplia diversidad de técnicas habitualmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Teóricamente es posible expresar los anticuerpos de la divulgación en células hospedadoras procariotas o eucariotas. La expresión de anticuerpos en células eucariotas, por ejemplo, células hospedadoras de mamífero, levaduras u hongos filamentosos, se analiza porque dichas células eucariotas y, en particular, células de mamífero, tienen mayor probabilidad que las células procariotas de ensamblar y secretar el anticuerpo plegado apropiadamente e inmunológicamente activo.

En una realización específica, un vector de clonación o expresión de acuerdo con la divulgación comprende al menos una de las secuencias codificantes de la tabla 3, unida de forma funcional a secuencias promotoras adecuadas. En otra realización específica, un vector de clonación o expresión de acuerdo con la divulgación comprende al menos una de las secuencias codificantes de la tabla 4, unida de forma funcional a secuencias promotoras adecuadas.

Las células hospedadoras de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes de la divulgación incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 usadas con un marcador de selección de DHFR, por ejemplo, como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp 1982, Mol. Biol. 159:601-621), líneas celulares CHOK1 dhfr+, células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para su uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión es el sistema de expresión del gen GS mostrado en las publicaciones PCT WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 0 338 841.

En una realización, las células hospedadoras de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes de la divulgación incluyen líneas celulares de mamífero defectuosas en la expresión del gen FUT8, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos 6946292.

5 Cuando se introducen vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpo en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en que se cultivan las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos convencionales de purificación de proteínas (véase, por ejemplo, Abhinav *et al.* 2007, Journal of Chromatography 848:28-37).

En una realización específica, la célula hospedadora de la divulgación es una célula hospedadora transfectada con un vector de expresión que tiene las secuencias codificantes seleccionadas del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 18, 31, 51, 19, 28, 32, 38, 40, 46, 48, 52, 56 y 58, adecuadas para la expresión de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5, respectivamente, unidas de forma funcional a secuencias promotoras adecuadas.

Las últimas células hospedadoras después pueden cultivarse adicionalmente en condiciones adecuadas para la expresión y producción de un anticuerpo de la divulgación seleccionado del grupo que consiste en XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5, respectivamente.

20 **Inmunconjugados**

En otro aspecto, la presente divulgación encarna un anticuerpo anti-IL-17A de la divulgación, o un fragmento del mismo, conjugado a un resto activo o terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunodepresor) o una radiotoxina. Dichos conjugados se denominan en este documento "inmunconjugados". Esto puede ser particularmente preferido si la IL-17A se expresa sobre la superficie de células Th17 (Brucklacher-Waldert *et al.* 2009, J Immunol. 183:5494-501).

Los inmunconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, destruya) las células. Ejemplos incluyen taxon, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, t. colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoesteroides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos o homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, 35 antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazina), agentes de ablación (por ejemplo, mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino, antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (previamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (previamente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse a un anticuerpo de la divulgación incluyen duocarmicinas, calicheamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo con calicheamicina está disponible en el mercado (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

Las citotoxinas pueden conjugarse a los anticuerpos de la divulgación usando la tecnología de conectores disponible en la técnica. Ejemplos de tipos de conectores que se han usado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, aunque sin limitación, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y conectores que contienen péptidos. Se puede elegir un conector que sea, por ejemplo, susceptible de escisión por pH bajo dentro del compartimiento lisosómico o susceptible de escisión por proteasas, tales como proteasas expresadas preferentemente en tejido tumoral tal como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

Para un análisis adicional de los tipos de citotoxinas, conectores y métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véase también Saito, G. *et al.* 2003, Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail, P.A. *et al.* 2003, Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne, G. 2003, Cancer Cell 3:207-212; Allen, T.M. 2002, Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. 2002, Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. 2001, Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264.

Los anticuerpos de la presente divulgación también pueden conjugarse con un isótopo radioactivo para generar radiofármacos citotóxicos, también denominados radioinmunconjugados. Ejemplos de isótopos radioactivos que se pueden conjugar con anticuerpos para uso diagnóstico o terapéutico incluyen, aunque sin limitación, yodo¹³¹, indio¹¹¹, itrio⁹⁰ y lutecio¹⁷⁷. Los métodos para preparar radioinmunconjugados están establecidos en la técnica. Ejemplos de radioinmunconjugados están disponibles en el mercado, incluyendo Zevalin™ (DEC Pharmaceuticals) y Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), y pueden usarse métodos similares para preparar radioinmunconjugados usando los anticuerpos de la divulgación.

Los conjugados de anticuerpo de la divulgación pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, y no se deduce que el resto de fármaco tenga que estar limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa o fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón- γ ; o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL1"), interleucina-2 ("IL2"), interleucina-6 ("IL6"), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar dicho resto terapéutico a los anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Amon *et al.* 1985, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pág. 243-56; Hellstrom *et al.* 1987, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2.^a Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pág. 623-53; Thorpe 1985, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pág. 475-506; Thorpe *et al.* 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58.

Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, la presente divulgación encarna moléculas biespecíficas o multiespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-IL-17A/AF o parte de unión a antígeno del mismo de la divulgación. Un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la divulgación puede derivatizarse o unirse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se una a al menos dos sitios de unión o moléculas diana diferentes. El anticuerpo o proteína de la divulgación, de hecho, puede derivatizarse o unirse a más de una molécula funcional diferente para generar moléculas multiespecíficas que se unan a más de dos sitios de unión y/o moléculas diana diferentes; se pretende que dichas moléculas multiespecíficas también estén englobadas por la expresión "molécula biespecífica" como se usa en este documento. Para crear una molécula biespecífica de la divulgación, un anticuerpo o proteína de la divulgación puede unirse funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro tipo) a una o más moléculas de unión diferentes, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de modo que se produzca una molécula biespecífica.

Por consiguiente, la presente divulgación incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión por IL-17A, por ejemplo, una parte de unión a antígeno de uno cualquiera de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5 y una segunda especificidad de unión por un segundo epítipo diana. Por ejemplo, el segundo epítipo diana es otro epítipo de IL-17A diferente del primer epítipo diana. Otro ejemplo es una molécula biespecífica que comprende al menos una primera especificidad de unión por IL-17A, por ejemplo, una parte de unión a antígeno de uno cualquiera de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5 y una segunda especificidad de unión por epítipo en otra parte dentro de IL-17A o dentro de otro antígeno diana.

Además, para la divulgación en que la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir además una tercera especificidad de unión, además del primer y segundo epítipo diana.

En una realización, las moléculas biespecíficas de la divulgación comprenden como especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab)₂, Fv o un Fv monocaténario. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o de cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o una construcción monocaténaria como se describe en Ladner *et al.* patente de Estados Unidos n.º 4946778.

Otros anticuerpos que pueden emplearse en las moléculas biespecíficas de la divulgación son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

Las moléculas biespecíficas de la presente divulgación pueden prepararse conjugando las especificidades de unión constituyentes, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse por separado y después conjugarse entre ellas. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se puede usar una diversidad de agentes de acoplamiento o reticulación para la conjugación covalente. Ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-l-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsky *et al.* 1984, *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.* 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus 1985, *Behring Ins. Mitt.* n.º 78118-132; Brennan *et al.* 1985, *Science* 229:81-83), y Glennie *et al.* 1987, *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, se pueden conjugar mediante enlaces sulfhidrilo de las regiones de bisagra del extremo C de las dos cadenas pesadas. En una realización particular, la región de bisagra se modifica para que contenga un número impar de restos sulfhidrilo, por ejemplo, uno, antes de la conjugación.

5 Como alternativa, ambas especificidades de unión pueden estar codificadas en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula hospedadora. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión de mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la divulgación puede ser una molécula monocatenaria que comprenda un anticuerpo monocatenario y un determinante de unión, o una molécula biespecífica monocatenaria que comprenda dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas monocatenarias. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5260203; la patente de Estados Unidos n.º 5455030; la patente de Estados Unidos n.º 4881175; la patente de Estados Unidos n.º 5132405; la patente de Estados Unidos n.º 5091513; la patente de Estados Unidos n.º 5476786; la patente de Estados Unidos n.º 5013653; la patente de Estados Unidos n.º 5258498; y la patente de Estados Unidos n.º 5482858.

15 La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas puede confirmarse, por ejemplo, por ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), radioinmunoensayo (REA), análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento) o ensayo de transferencia de Western. Cada uno de estos ensayos en general detecta la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de particular interés empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés.

Anticuerpos multivalentes

25 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos multivalentes que comprenden al menos dos partes de unión a antígeno idénticas o diferentes de los anticuerpos de la divulgación que se unen a IL-17A, por ejemplo, seleccionadas de partes de unión a antígeno de uno cualquiera de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5. En una realización, los anticuerpos multivalentes proporcionan al menos dos, tres o cuatro partes de unión a antígeno de los anticuerpos. Las partes de unión a antígeno pueden unirse mediante fusión de proteínas o enlace covalente o no covalente. Como alternativa, se han descrito métodos de enlace para las moléculas biespecíficas. Pueden obtenerse compuestos tetravalentes, por ejemplo, reticulando anticuerpos de la divulgación con un anticuerpo que se una a las regiones constantes de los anticuerpos de la divulgación, por ejemplo, la región Fc o de bisagra.

Composiciones farmacéuticas

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos de la presente divulgación, por ejemplo, un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5, formulado junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos, o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la divulgación. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la divulgación puede comprender una combinación de anticuerpos o proteínas que se unen a diferentes epítomos en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

45 Las composiciones farmacéuticas de la divulgación también pueden administrarse en politerapia, es decir, combinados con otros agentes. Por ejemplo, la politerapia puede incluir un anticuerpo anti-IL-17A o proteína de la presente divulgación, por ejemplo, un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5, combinado con al menos otro antiinflamatorio u otro agente quimioterápico, por ejemplo, un agente inmunodepresor. Ejemplos de agentes terapéuticos que pueden usarse en politerapia se describen en mayor detalle a continuación en la sección sobre usos de los anticuerpos o proteínas de la divulgación.

50 Como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. El vehículo debe ser adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, medular o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). En una realización, el vehículo debe ser adecuado para vía subcutánea. Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, inmunoconjugado o molécula biespecífica, puede recubrirse en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

60 Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto precursor y no confiere ningún efecto toxicológico indeseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M., *et al.* 1977, J. Pharm. Sci. 66:1-19). Ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos atóxicos tales como ácidos

mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos fenil-sustituidos, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas atóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición farmacéutica de la divulgación también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes hidrosolubles tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes liposolubles tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados, que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, humectantes, emulsionantes y dispersantes. Evitar la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto mediante procedimientos de esterilización como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir en las composiciones agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retarden la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación improvisada de una dispersión o soluciones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida que cualquier medio convencional o agente sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la divulgación. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios a las composiciones.

Las composiciones terapéuticas habitualmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una concentración de fármaco elevada. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, polioliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, se pueden incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Pueden encontrarse revisiones sobre el desarrollo de formulaciones de proteína estables (por ejemplo, anticuerpo) en Cleland *et al.* 1993, Crit. Reviews. Ther. Drug Carrier Systems 10(4):307-377 y Wei Wang 1999, Int. J. Pharmaceutcs 185:129-88. Pueden encontrarse análisis sobre formulaciones adicionales para anticuerpos, por ejemplo, en Daugherty y Mrsny 2006, Advanced Drug Delivery Reviews 58: 686-706; patentes de Estados Unidos n.º 6171586, 4618486, publicación de Estados Unidos n.º 20060286103, publicación PCT WO 06/044908, WO 07/095337, WO 04/016286, Colandene *et al.* 2007, J. Pharm. Sci 96: 1598-1608; Schulman 2001, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164:S6-S11 y otras referencias conocidas.

Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación intradérmica o subcutánea típicamente incluyen uno o más de los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos, agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos, antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio, agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético, tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Dichas preparaciones pueden confinarse en ampollas, jeringas desechables o viales multidosis hechos de vidrio o plástico.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera,

seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los anticuerpos o proteínas de la divulgación en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada a esterilidad del mismo.

En una realización específica, los anticuerpos XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5 se administraron como una formulación líquida en un vial. La cantidad de fármaco por vial fue 150 mg. El líquido contenía 150 mg/ml de anticuerpo, L-histidina 4,8 mM, L-histidina-HCl 15,2 mM, sacarosa 220 mM y Polisorbato 20 al 0,04 %, a pH 6,0 ± 0,5. Se añadió un sobrellenado de un 20 % para permitir la retirada de la dosis pretendida.

La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una forma farmacéutica individual variará dependiendo del sujeto que se está tratando y del modo particular de administración. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una forma farmacéutica individual será generalmente la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de un cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente un 0,01 por ciento a aproximadamente un noventa y nueve por ciento de principio activo, de aproximadamente un 0,1 por ciento a aproximadamente un 70 por ciento o de aproximadamente un 1 por ciento a aproximadamente un 30 por ciento de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las pautas posológicas se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o incrementar de forma proporcional la dosis según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente favorable formular composiciones parenterales en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma farmacéutica unitaria, como se usa en este documento, se refiere a unidades físicamente concretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas farmacéuticas unitarias de la divulgación están dictaminadas por y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de formulación de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Para la administración del anticuerpo o proteína, la dosificación varía de aproximadamente 0,0001 a 150 mg/kg, tal como 5, 15 y 50 mg/kg de administración subcutánea, y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Una pauta de tratamiento ejemplar implica administración una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Las pautas posológicas para un anticuerpo anti-IL-17A o proteína de la divulgación incluyen 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg o 30 mg/kg por administración intravenosa, administrándose el anticuerpo usando uno de los siguientes esquemas de dosis: cada cuatro semanas para seis dosificaciones, después cada tres meses; cada tres semanas; 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado está dentro de los intervalos indicados. Los anticuerpos o proteínas de la divulgación se administran habitualmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosificaciones individuales pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, cada tres meses o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, según se indique midiendo los niveles sanguíneos de anticuerpo contra el antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración plasmática de anticuerpo de aproximadamente 1-1000 µg/ml y, en algunos métodos, aproximadamente 25-300 µg/ml.

Como alternativa, el anticuerpo o proteína puede administrarse como una formulación de liberación mantenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguidos de los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja con intervalos relativamente poco frecuentes durante un periodo de tiempo prolongado. Algunos pacientes siguen recibiendo el tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, en ocasiones se requiere una dosificación relativamente elevada a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduzca o termine, o hasta que el paciente muestre una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

Los niveles de dosis reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden variar para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente divulgación empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, estado, salud general y antecedentes médicos previos del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-IL-17A o proteína de la divulgación puede provocar una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los periodos sin síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debida al padecimiento de la enfermedad.

Una composición de la presente divulgación puede administrarse por una o más vías de administración usando uno o más de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciarán los expertos en la materia, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración para anticuerpos de la divulgación incluyen vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, medular u otra vía parenteral de administración, por ejemplo, por inyección o infusión. La frase "administración parenteral", como se usa en este documento, significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbitaria, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intrarraquídea, epidural e intraesternal.

Como alternativa, un anticuerpo o proteína de la divulgación puede administrarse por vía no parenteral, tal como vía tópica, epidérmica o a la mucosa de administración, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los anticuerpos o proteínas de la divulgación pueden prepararse con vehículos que protegerán a los anticuerpos frente a la rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, una composición terapéutica de la divulgación puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos mostrados en las patentes de Estados Unidos n.º 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 o 4596556. Ejemplos de implantes bien conocidos y módulos útiles en la presente divulgación incluyen: la patente de Estados Unidos n.º 4487603, que muestra una microbomba de infusión implantable para dispensar la medicación a una tasa controlada; la patente de Estados Unidos n.º 4486194, que muestra un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de Estados Unidos n.º 4447233, que muestra una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una tasa de infusión precisa; la patente de Estados Unidos n.º 4447224, que muestra un aparato de infusión implantable de flujo variable para el suministro continuo de fármacos; la patente de Estados Unidos n.º 4439196, que muestra un sistema de suministro de fármacos osmótico que tiene múltiples compartimentos de cámara; y la patente de Estados Unidos n.º 4475196, que muestra un sistema de suministro de fármacos osmótico. Muchos otros de estos implantes, sistemas de suministro y módulos son conocidos para los expertos en la materia.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos o proteínas de la divulgación pueden formularse para garantizar la apropiada distribución *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos muy hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la divulgación atraviesen la barrera hematoencefálica BHE (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 4522811; 5374548; y 5399331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente a células u órganos específicos, por tanto, potencian el suministro dirigido de fármacos (véase, por ejemplo, V.V. Ranade 1989, J. Cline Pharmacol. 29:685). Los restos de dirección ejemplares incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5416016 de Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.* 1988, Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman *et al.* 1995, FEBS Lett. 357:140; M. Owais *et al.* 1995, Antimicrob. Agents Chemoth. 39:180); receptor de proteína A tensoactiva (Briscoe *et al.* 1995, Am. J. Physiol. 269:9090); p120 (Schreier *et al.* 1994, J. Biol. Chem. 269:9090); véase también Keinanen y Laukkanen 1994, FEBS Lett. 346:123; Killion y Fidler 1994, Immunomethods 4:273.

Usos y métodos de la divulgación

5 Los anticuerpos o proteínas de la presente divulgación tienen utilidades terapéuticas y de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*.
 Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*, o en un sujeto, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir o diagnosticar una diversidad de trastornos.

10 Los métodos son particularmente adecuados para tratar, prevenir o diagnosticar trastornos relacionados con IL-17A y/o trastornos autoinmunitarios e inflamatorios, por ejemplo, artritis reumatoide o psoriasis.

15 Específicamente, la divulgación proporciona un método de tratamiento de trastornos relacionados con IL-17A y/o trastornos autoinmunitarios e inflamatorios. En determinadas realizaciones, el método comprende la etapa de administrar el anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la divulgación, a un sujeto que lo necesita.

La divulgación también proporciona métodos para disminuir o suprimir la respuesta de señalización inducida por IL-17A o IL-17AF en células o tejidos diana poniendo en contacto una célula con una composición que comprende una dosis terapéuticamente eficaz de los anticuerpos de la divulgación.

20 La divulgación también proporciona métodos para disminuir los niveles de IL6, CXCL1, IL-8, GM-CSF y/o CCL2 en una célula, que comprenden la etapa de poner en contacto una célula con anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como una parte de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la divulgación.

25 En la presente descripción, la expresión "enfermedad mediada por IL-17A/AF" o "trastorno relacionado con IL-17A/AF" abarca todas las enfermedades y afecciones médicas en que IL-17A o IL-17AF desempeña una función, ya sea directamente o indirectamente, en la enfermedad o afección médica, incluyendo la provocación, desarrollo, progreso, persistencia o patología de la enfermedad o afección. Por consiguiente, estas expresiones incluyen afecciones asociadas con o caracterizadas por niveles aberrantes de IL-17A/AF y/o enfermedades o afecciones que pueden tratarse reduciendo o suprimiendo la actividad inducida por IL-17A/AF en células o tejidos diana, por ejemplo, la
 30 producción de IL-6 o GRO-alfa. Estas incluyen afecciones inflamatorias y enfermedades autoinmunitarias, tales como reumatismo articular, artritis reumatoide o psoriasis. Estas incluyen además alergias y afecciones alérgicas, reacciones de hipersensibilidad, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística y rechazo de trasplante de órgano o tejido.

35 Por ejemplo, los anticuerpos o proteínas de la divulgación pueden usarse para el tratamiento de receptores de trasplante de corazón, pulmón, corazón y pulmón combinados, hígado, riñón, páncreas, piel o córnea, incluyendo rechazo de aloinjerto o rechazo de xenoinjerto, y para la prevención de la enfermedad de injerto contra hospedador, tal como después de trasplante de médula ósea, y arterioesclerosis asociada a trasplante de órganos.

40 Los anticuerpos o proteínas de la divulgación, aunque sin limitarse a ello, son útiles para el tratamiento, prevención o mejora de enfermedades autoinmunitarias y de afecciones inflamatorias, en particular afecciones inflamatorias con una etiología que incluye un componente autoinmunitario tal como reumatismo articular (por ejemplo artritis reumatoide, reumatismo articular crónico progresivo y reumatismo articular deformante) y enfermedades reumáticas, incluyendo afecciones inflamatorias y enfermedades reumáticas que implican disminución de masa ósea, dolor
 45 inflamatorio, espondiloartropatías incluyendo espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, reumatismo articular reactivo, artropatía psoriásica, artritis idiopática juvenil y reumatismo articular por enteropatía, entesitis, hipersensibilidad (incluyendo tanto hipersensibilidad de las vías respiratorias como hipersensibilidad dérmica) y alergias. Enfermedades autoinmunitarias específicas para las que pueden emplearse anticuerpos de la divulgación incluyen trastornos hemáticos autoinmunitarios (incluyendo, por ejemplo, anemia hemolítica, anemia aplásica, anemia
 50 pura de la serie roja y trombocitopenia idiopática), lupus eritematoso disseminado (LED), nefritis lúpica, enfermedades musculares inflamatorias (dermatomiositis), periodontitis, policondritis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, dermatomiositis, hepatitis activa crónica, miastenia grave, psoriasis, síndrome de Steven-Johnson, esprúe idiopático, enfermedad autoinmunitaria inflamatoria del intestino (incluyendo, por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y síndrome de intestino irritable), oftalmopatía endocrina, enfermedad de Graves, sarcoidosis, esclerosis múltiple,
 55 esclerosis disseminada, enfermedades fibróticas, cirrosis biliar primaria, diabetes juvenil (diabetes sacarina de tipo I), uveítis, queratoconjuntivitis seca y queratoconjuntivitis primaveral, fibrosis pulmonar intersticial, osteólisis periprotésica, glomerulonefritis (con y sin síndrome nefrótico, por ejemplo, incluyendo síndrome nefrótico idiopático o nefropatía con cambios mínimos), mieloma múltiples, otros tipos de tumores, enfermedad inflamatoria de la piel y la córnea, miositis, pérdida de implantes óseos, trastornos metabólicos (tales como obesidad, aterosclerosis y otras
 60 enfermedades cardiovasculares incluyendo cardiomiopatía dilatada, miocarditis, diabetes sacarina de tipo II y dislipidemia) y enfermedades tiroideas autoinmunitarias (incluyendo tiroiditis de Hashimoto), vasculitis primaria de vasos pequeños y medios, vasculitis de vasos grandes, incluyendo arteritis de gigantocitos, hidrosadenitis supurante, neuromielitis óptica, síndrome de Sjögren, enfermedad de Behcet, dermatitis atópica y por contacto, bronquiolitis, enfermedades musculares inflamatorias, neuropatías periféricas autoinmunitarias, enfermedades renales, hepáticas
 65 y tiroideas inmunológicas, inflamación y aterotrombosis, síndromes de fiebre autoinflamatoria, trastornos

inmunoemáticos, y enfermedades vesiculares de la piel y las membranas mucosas. Anatómicamente, la uveítis puede ser anterior, intermedia, posterior o panuveítis. Puede ser crónica o aguda. La etiología de la uveítis puede ser autoinmunitaria o no infecciosa, infecciosa, asociada con enfermedad sistémica, o un síndrome de manchas blancas.

5 Los anticuerpos o proteínas de la divulgación también pueden ser útiles para el tratamiento, prevención o mejora de asma, bronquitis, bronquiolitis, neumonías intersticiales idiopáticas, neumoconiosis, enfisema pulmonar y otras enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias.

10 Los anticuerpos o proteínas de la divulgación también pueden ser útiles para tratar enfermedades del metabolismo óseo, incluyendo artrosis, osteoporosis y otro tipo de artritis, y disminución de masa ósea en general, incluyendo disminución de masa ósea senil, y en particular enfermedad periodontal.

15 Además, los anticuerpos o proteínas de la divulgación también pueden ser útiles para tratar la candidiasis crónica y otras enfermedades fúngicas crónicas, así como complicaciones de infecciones con parásitos, y para complicaciones del tabaquismo se consideran medios prometedores de tratamiento, así como para infección vírica y complicaciones de infección vírica.

20 La inhibición de IL-17 y su receptor están entre los nuevos modos más prometedores de acciones (MOA) para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, siendo psoriasis la indicación más avanzada entre varias enfermedades actualmente en estudio para el desarrollo de fármacos moduladores de IL-17 (Miossec P y Kolls JK. 2012, Nat Rev Drug Discov.10:763-76). Varios estudios han demostrado de forma inequívoca que el bloqueo de IL-17A en pacientes con psoriasis en placas de moderada a grave es segura a corto plazo e induce mejoras muy notables (por ejemplo, Hueber W, Patel DD, Dryja T, *et al.* 2010, Sci Transl Med.; 2:52ra72). Estos hallazgos superaron las expectativas y confirmaron la hipótesis de que IL-17A es una molécula de señalización clave en la patogenia de psoriasis (Garber K. 2012, Nat Biotechnology 30:475-477).

30 Además, en varios modelos animales, incluyendo el modelo más común de esclerosis múltiple (EM) de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, la IL-17 es central en los procesos inflamatorios (Bettelli E, *et al.* 2008, Nature; 453:1051-57, Wang HH, *et al.* 2011, J Clin Neurosci; 18(10):1313-7, Matsushita T, *et al.* 2013, PLoS One; 8(4):e64835). Los efectos de IL-17 son principalmente proinflamatorios, y sinergizan con otras citocinas. Los efectos de IL-17, tales como la inducción de producción de citocinas por células epiteliales, la regulación por aumento de interleucina (IL)-1b, factor de necrosis tumor alfa (TNF α) y metaloproteínasa de matriz (MMP)-9 en macrófagos, y la inducción de la secreción de IL 6, IL-8 y prostaglandina E2, se ajustan bien con muchos aspectos de la patología de EM. También hay datos que apoyan lo contrario a una función central de IL-17 en neuroinflamación, incluyendo modelos de sobreexpresión transgénica en ratones (Haak S *et al.* 2009, JCI; 119:61-69).

40 El asma es una enfermedad inflamatoria heterogénea de las vías respiratorias que se manifiesta clínicamente mediante síntomas de obstrucción del flujo de aire que varía en gravedad espontáneamente o en respuesta a tratamiento. Mientras el asma se ha considerado impulsado por linfocitos T auxiliares de tipo 2 (Th2) y sus productos, los datos recientes sugieren que hay un gen de elevada Th2 distintivo presente en las vías respiratorias de solamente ~50 % de los sujetos con asma (Woodruff PG *et al.* 2009, Am J Respir Crit Care Med 180:388-95). La inflamación neutrófila es dominante en asma agudo grave; algunos individuos con asma presentan neutrofilia prominente en esputo y una mala respuesta clínica a esteroides inhalados y/u orales (Wenzel 2012, Nature Med 18:716-25).

45 Se ha informado de niveles aumentados de IL-17A que se correlacionan con la gravedad del asma en la circulación y las vías respiratorias de individuos con asma en comparación con controles sanos. Los estudios preclínicos en modelos de ratón de inflamación pulmonar alérgica han implicado una necesidad de IL-17A y su receptor (IL-17RA) en inflamación neutrófila de las vías respiratorias e hipersensibilidad de las vías respiratorias resistente a esteroides. Por tanto, las propiedades de IL-17A *in vitro*, su presencia en cantidades aumentadas en asma, y los modelos preclínicos de la enfermedad respaldan una función de IL-17A en las formas neutrófila y/o de bajo Th2 de la enfermedad que son poco sensibles a esteroides (Cosmi L *et al.* 2009, Am J Respir Crit Care Med 180:388-95). Por tanto, la siguiente lista de afecciones comprende dianas particularmente preferidas para el tratamiento con anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos de acuerdo con la divulgación: Esclerosis múltiple, psoriasis, asma, lupus eritematoso diseminado (LED) y nefritis lúpica.

60 Los anticuerpos o proteínas de la divulgación pueden administrarse como único principio activo o junto con, por ejemplo, como un adyuvante de o en combinación con, otros fármacos, por ejemplo, agentes inmunodepresores o inmunomoduladores u otros agentes antiinflamatorios u otros agentes citotóxicos o antineoplásicos, por ejemplo, para el tratamiento o prevención de enfermedades mencionadas anteriormente. Por ejemplo, los anticuerpos de la divulgación pueden usarse en combinación con DMARD, por ejemplo, sales de oro, sulfasalazina, antimalaríales, metotrexato, D-penicilamina, azatioprina, ácido micofenólico, tacrolímús, sirolímús, minociclina, leflunomida, glucocorticoesteroides; un inhibidor de calcineurina, por ejemplo, ciclosporina A o FK 506; un modulador de la recirculación de linfocitos, por ejemplo, FTY720 y análogos de FTY720; un inhibidor de mTOR, por ejemplo, rapamicina, 40-O-(2-hidroxietyl)-rapamicina, CCI779, ABT578, AP23573 o Tafa-93; una ascomicina que tiene

propiedades inmunodepresoras, por ejemplo, ABT-281, ASM981, etc.; corticoesteroides; ciclofosfamida; azatioprina; leflunomida; mizoribina; micofenolato de mofetilo; 15-desoxiespergualina o un homólogo inmunodepresor, análogo o derivado del mismo; anticuerpos monoclonales inmunodepresores, por ejemplo, anticuerpos monoclonales contra receptores de leucocitos, por ejemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD40, CD45, CD58, CD80, CD86 u otros ligandos; otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo, una molécula de unión recombinante que tiene al menos una parte del dominio extracelular de CTLA4 o un mutante del mismo, por ejemplo, al menos una parte extracelular de CTLA4 o un mutante del mismo unido a una secuencia proteínica que no es de CTLA4, por ejemplo, CTLA4lg (por ejemplo, indicada ATCC 68629) o un mutante del mismo, por ejemplo, LEA29Y; inhibidores de moléculas de adhesión, por ejemplo, antagonistas de LFA-1, antagonistas de ICAM-1 o 3, antagonistas de VCAM-4 o antagonistas de VLA-4; o un agente quimioterápico, por ejemplo, paclitaxel, gemcitabina, cisplatino, doxorubicina o 5-fluorouracilo; agentes anti-TNF, por ejemplo, anticuerpos monoclonales contra TNF, por ejemplo, infliximab, adalimumab, CDP870 o construcciones de receptor para TNF-RI o TNF-RII, por ejemplo, Etanercept, PEG-TNF-RI; bloqueantes de citocinas proinflamatorias, bloqueantes de IL1, por ejemplo, Anakinra o IL1 trap, canakinumab, bloqueantes de IL13, bloqueantes de IL4, bloqueantes de IL6, otros bloqueantes de IL17 (tales como secukinumab, brodalumab, ixekizumab); bloqueantes de quimiocinas, por ejemplo, inhibidores o activadores de proteasas, por ejemplo, metaloproteasas, anticuerpos anti-IL15, anticuerpos anti-IL6, anticuerpos anti-IL4, anticuerpos anti-IL13, anticuerpos anti-CD20, AINES, tales como aspirina o un agente antiféccioso (la lista no se limita al agente mencionado).

De acuerdo con lo anterior, la presente divulgación proporciona, en un aspecto adicional más: Un método como se define anteriormente, que comprende la coadministración, por ejemplo, simultáneamente o en secuencia, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-17A o parte de unión a antígeno del mismo como se divulga en este documento, y al menos una segunda sustancia farmacéutica, siendo dicha segunda sustancia farmacéutica un fármaco inmunodepresor/inmunomodulador, antiinflamatorio quimioterápico o antiféccioso, por ejemplo, como se indica anteriormente.

O, una combinación terapéutica, por ejemplo, un kit, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de a) un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo como se divulga en este documento, y b) al menos una segunda sustancia seleccionada de un fármaco inmunodepresor/inmunomodulador, antiinflamatorio quimioterápico o antiféccioso, por ejemplo, como se indica anteriormente. El kit puede comprender instrucciones para su administración.

Cuando los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos como se divulga en este documento se administran junto con otro tratamiento inmunodepresor/inmunomodulador, antiinflamatorio quimioterápico o antiféccioso, las dosificaciones del compuesto de combinación coadministrado variarán, por supuesto, dependiendo del tipo de cofármaco empleado, por ejemplo, si es un DMARD, anti-TNF, bloqueante de IL1 u otros, del fármaco específico empleado, de la afección que se esté tratando y así sucesivamente.

En una realización, los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos pueden usarse para detectar los niveles de IL-17A, o los niveles de células que contienen IL-17A. Esto puede conseguirse, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra (tal como una muestra *in vitro*) y una muestra de control con el anticuerpo anti-IL-17A (o proteína) en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo e IL-17A. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo (o proteína) e IL-17A se detecta y compara en la muestra y el control. Por ejemplo, pueden realizarse métodos convencionales de detección, bien conocidos en la técnica, tales como ELISA y ensayos citométricos de flujo, usando las composiciones de la divulgación.

Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación proporciona además métodos para detectar la presencia de IL-17A (por ejemplo, antígeno de IL-17A humana) en una muestra, o medir la cantidad de IL-17A, que comprenden poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-17A, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o parte del mismo e IL-17A. Entonces se detecta la formación de un complejo, en el que una diferencia en la formación de complejo entre la muestra y la muestra de control es indicativa de la presencia de IL-17A en la muestra.

También dentro del alcance de la divulgación hay kits que consisten en las composiciones (por ejemplo, anticuerpos, proteínas, anticuerpos humanos y moléculas biespecíficas) de la divulgación e instrucciones de uso. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional, o uno o más anticuerpos o proteínas adicionales de la divulgación (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una actividad complementaria que se une a un epítopo en el antígeno diana distinto del primer anticuerpo). Los kits típicamente incluyen una etiqueta que indica el uso pretendido de los contenidos del kit. El término etiqueta incluye cualquier material por escrito o grabado aportado en o con el kit, o que acompañe de otro modo al kit. El kit puede comprender además herramientas para diagnosticar si un paciente pertenece a un grupo que responderá a un tratamiento con anticuerpo anti-IL-17A, como se define anteriormente.

La divulgación que se ha descrito completamente, ahora se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y reivindicaciones, que son ilustrativos y no pretenden ser más limitantes.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 proporciona la estructura tridimensional del Fab XAB1. La figura 1A es una representación de relleno de espacios. La figura 1B es una representación de dibujos.
- La figura 2 proporciona la estructura tridimensional del complejo de Fv XAB1 con IL-17A humana. La figura 2A muestra los dos fragmentos Fv XAB1 en representación de relleno de espacios y la figura 2B muestra los dos fragmentos Fv XAB1 en representación de dibujos.
- 10 La figura 3 muestra gráficos de resultados de ELISA de acuerdo con un ejemplo. La numeración del gráfico corresponde a la denominación de candidatos de la siguiente manera: 1 es MB440; 2 es MB464; 3 es MB468; 4 es MB444; 5 es MB435; 6 es MB463; 7 es XAB1. La figura 3A es un gráfico que muestra la señal normalizada frente a la concentración de Fab (M). La figura 3B es un gráfico que muestra la señal remanente normalizada frente al tiempo de incubación de lavado (horas). La figura 3C es un gráfico que muestra la señal normalizada frente a la concentración de competidor Fab (M).
- 15 La figura 4 proporciona la estructura tridimensional del complejo de Fv XAB2 con IL-17A humana. La figura 4A muestra los dos fragmentos Fv XAB2 en representación de relleno de espacios y la figura 4B muestra los dos fragmentos Fv XAB2 en representación de dibujos.
- La figura 5 proporciona la estructura tridimensional del complejo de Fv XAB2 con IL-17A humana como una vista en primer plano.
- 20 La figura 6 proporciona la estructura tridimensional del complejo de Fv XAB5 con IL-17A humana. La figura 6A muestra los dos fragmentos Fv XAB5 en representación de relleno de espacios y la figura 6B muestra los dos fragmentos Fv XAB5 en representación de dibujos.
- La figura 7 proporciona la estructura tridimensional del complejo de Fv XAB5 con IL-17A humana, como una vista en primer plano de la L-CDR1 del anticuerpo.
- 25 La figura 8 proporciona la estructura tridimensional del complejo de Fv XAB4 con IL-17A humana. La figura 8A muestra los dos fragmentos Fv XAB4 en representación de relleno de espacios, la figura 8B muestra los dos fragmentos Fv XAB4 en representación de dibujos.
- La figura 9 proporciona la estructura tridimensional del complejo de Fv XAB4 con IL-17A humana como una vista en primer plano de la L-CDR1 del anticuerpo.
- 30 La figura 10 proporciona la estructura tridimensional del complejo de Fv XAB4 con IL-17A humana como una vista en primer plano de la L-CDR2 del anticuerpo.
- La figura 11 es un gráfico que muestra la puntuación terapéutica para XAB4 en un modelo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE).
- 35 La figura 12 es un gráfico que muestra el cambio terapéutico del peso (%) de animales en el modelo de EAE.
- La figura 13 es un gráfico que muestra las puntuaciones terapéuticas acumuladas en el modelo de EAE.
- Las figuras 14 y 15 son gráficos que muestran comparaciones de la puntuación terapéutica antes y después del tratamiento en el modelo de EAE.
- La figura 16 es un gráfico que muestra la puntuación profiláctica para XAB4 en el modelo de EAE.
- 40 La figura 17 es un gráfico que muestra el cambio profiláctico del peso (%) de animales en el modelo de EAE.
- La figura 18 es un gráfico que muestra las puntuaciones profilácticas acumuladas en el modelo de EAE.
- La figura 19 es un gráfico que muestra las puntuaciones profilácticas máximas en el modelo de EAE.
- La figura 20 es un gráfico que muestra la aparición de EAE en el modelo de EAE.
- La figura 21 es un gráfico que muestra el efecto antagonista de XAB4 sobre la liberación de IL-6 en un modelo de astrocitos humanos.
- 45 La figura 22 es un gráfico que muestra el efecto antagonista de XAB4 sobre la liberación de CXCL1 en el modelo de astrocitos humanos.
- La figura 23 es un gráfico que muestra el efecto antagonista de XAB4 sobre la liberación de IL-8 en el modelo de astrocitos humanos.
- 50 La figura 24 es un gráfico que muestra el efecto antagonista de XAB4 sobre la liberación de GM-CSF en el modelo de astrocitos humanos.
- La figura 25 es un gráfico que muestra el efecto antagonista de XAB4 sobre la liberación de CCL2 en el modelo de astrocitos humanos.

Ejemplos

- 55 XAB1 es un anticuerpo monoclonal IgG1/k humano. Se generó usando técnicas convencionales de biología molecular. En resumen, se usó el sistema Medarex. Se inmunizaron ratones con IL-17A humana recombinante. Los ratones se sacrificaron mediante inhalación de CO₂ y se recogieron las células del bazo y se fusionaron con una línea celular de mieloma usando PEG 4000. Las células fusionadas se sembraron en placa en pocillos con una capa de alimentación de células peritoneales. Se recogieron los sobrenadantes de las células cultivadas y se ensayaron para los mAb reactivos a IL-17A por ELISA. Los clones positivos para la producción de mAb contra IL-17A se seleccionaron y sembraron en placa.
- 60

El hibridoma responsable de la secreción de XAB1 se identificó para caracterización adicional basándose en las características iniciales prometedoras de unión de anticuerpo/antígeno tales como la afinidad de unión por IL-17A, la

capacidad de bloquear la unión de IL-17A a su receptor y la capacidad de bloquear los efectos biológicos mediados por IL-17A en ensayos *in vitro*.

5 La secuencia de aminoácidos de XAB1 es la SEQ ID NO: 14 (cadena pesada) y la SEQ ID NO: 15 (cadena ligera). XAB1 se eligió para maduración posterior de la afinidad.

10 Como primera etapa hacia la maduración de la afinidad guiada por la estructura, se determinó la estructura cristalina del Fab XAB1 en estado libre, así como el correspondiente complejo de Fv con IL-17A humana como se describe a continuación. El análisis de la estructura tridimensional del complejo de Fv XAB1 con IL-17A humana permitió realizar un proceso racional de maduración de la afinidad junto con, y como alternativa a, un proceso más aleatorio. Se proporcionan más detalles a continuación.

15 Además, se usó cristalografía de rayos X para caracterizar algunos de los anticuerpos variantes de afinidad madurada que se generaron. El análisis de los datos cristalinos de las variantes de afinidad madurada permitió una comprensión más profunda del comportamiento de unión de los anticuerpos variantes y se descubrieron algunas propiedades inesperadas que se describirán adicionalmente a continuación.

Ejemplo 1. Estructura cristalina del Fab XAB1 en estado libre

20 (i) Material y métodos

Se usaron protocolos convencionales de biología molecular para obtener el fragmento de anticuerpo Fab XAB1. En resumen, se clonó el Fab y se expresó en *E. coli* W3110 con una marca de hexahistidina en el extremo C en la cadena pesada. La proteína recombinante se purificó por cromatografía con quelato de Ni seguida de cromatografía por exclusión de tamaños sobre una columna SPX-75 en TRIS 10 mM pH 7,4, NaCl 25 mM. El Fab XAB1 entonces se concentró por ultrafiltración a 10,4 mg/ml y se cristalizó.

30 Se siguieron protocolos convencionales de cristalización. En resumen, los cristales se hicieron crecer a 19 °C en placas de 96 pocillos de SD2, usando el método de difusión de vapor en gotas posadas. La solución madre de proteína se mezcló 1:1 con un tampón de cristalización que contenía PEG 300 al 40 %, fosfato de sodio-citrato 0,1 M pH 4,2. El tamaño de gota total fue de 0,4 µl. Antes de la recogida de datos de rayos X, se montó un cristal en una criosasa de nailon y se enfrió de forma ultrarrápida directamente en nitrógeno líquido. La recogida de datos de rayos X y el procesamiento se realizaron usando protocolos convencionales. En resumen, se recogieron datos de rayos X a resolución de 2,1 Å en la Swiss Light Source, línea de luz X10SA, con un detector MAR225 CCD, usando radiación de rayos X de 1,0000 Å. En total, se registraron 180 imágenes de 1,0° de oscilación cada una a una distancia del cristal al detector de 190 mm y se procesaron con el paquete de programa informático HKL2000. El cristal pertenecía al grupo espacial C2 con los parámetros de celda $a = 51,63 \text{ \AA}$, $b = 132,09 \text{ \AA}$, $c = 77,25 \text{ \AA}$, $\alpha = 90,00^\circ$, $\beta = 98,88^\circ$, $\gamma = 90,00^\circ$ y una molécula de Fab XAB1 en la unidad asimétrica. R-sym a resolución de 2,1 Å fue de un 10,4 % y la integridad de los datos de un 99,0 %.

40 La estructura se determinó por remplazo molecular con el programa PHASER. Se generaron modelos de búsqueda para los dominios V_H/V_L y C_H1/C_L a partir de PDB entrada 1HEZ. Se realizó construcción iterativa de modelos y refinado con los programas Coot (Crystallographic Object-Oriented Toolkit) y CNX (Crystallography & NMR eXplorer) versión 2002, hasta que no pudieron hacerse más mejoras significativas al modelo. R total y R libre para todos los datos fueron de 0,188 y 0,231, respectivamente. El modelo refinado final mostró una desviación de la media cuadrática (RMSD) de las longitudes de enlace y ángulos de enlace ideales de 0,004 Å y 0,9°, respectivamente.

(ii) Resultados

50 Los resultados del refinamiento de rayos X del Fab XAB1 se proporcionan en la tabla 9 y la estructura tridimensional se muestra en la figura 1.

Tabla 9. Refinamiento por rayos X del Fab XAB1 con el programa CNX.

OBSERVACIÓN	3
OBSERVACIÓN	3 REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN	3 PROGRAMA : CNX 2002
OBSERVACIÓN	3 AUTORES : Brunger, Adams, Clore, Delano,
OBSERVACIÓN	3 Gros, Grosse-Kunstleve, Jiang,
OBSERVACIÓN	3 Kuszewski, Nilges, Pannu, Read,
OBSERVACIÓN	3 Rice, Simonson, Warren
OBSERVACIÓN	3 y
OBSERVACIÓN	3 Accelrys Inc.,
OBSERVACIÓN	3 Yip, Dzakula).
OBSERVACIÓN	3
OBSERVACIÓN	3 DATOS USADOS EN EL REFINAMIENTO.

ES 2 758 473 T3

OBSERVACIÓN 3 INTERVALO DE RESOLUCIÓN ALTO (ANGSTROMS) : 2,10
 OBSERVACIÓN 3 INTERVALO DE RESOLUCIÓN BAJO (ANGSTROMS) : 33,33
 OBSERVACIÓN 3 VALOR DE CORTE DE DATOS (SIGMA(F)) : 0,0
 OBSERVACIÓN 3 VALOR DE CORTE DE DATOS ALTO (ABS(F)) : 19645630,62
 OBSERVACIÓN 3 VALOR DE CORTE DE DATOS BAJO (ABS(F)) : 0,000000
 OBSERVACIÓN 3 EXHAUSTIVIDAD (TRABAJO+ENSAYO) (%) : 98,2
 OBSERVACIÓN 3 NÚMERO DE REFLEJOS : 29298
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 AJUSTE A DATOS USADOS EN EL REFINAMIENTO.
 OBSERVACIÓN 3 MÉTODO DE VALIDACIÓN CRUZADA : TOTALIDAD
 OBSERVACIÓN 3 SELECCIÓN DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE : ALEATORIO
 OBSERVACIÓN 3 VALOR R (CONJUNTO DE TRABAJO) : 0,188
 OBSERVACIÓN 3 VALOR R LIBRE : 0,231
 OBSERVACIÓN 3 TAMAÑO DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE (%) : 4,9
 OBSERVACIÓN 3 RECUENTO DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE : 1436
 OBSERVACIÓN 3 ERROR ESTIMADO DE VALOR R LIBRE : 0,006
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 AJUSTE EN EL BIN DE MÁXIMA RESOLUCIÓN.
 OBSERVACIÓN 3 NÚMERO TOTAL DE BINS USADOS : 6
 OBSERVACIÓN 3 INTERVALO DE RESOLUCIÓN DE BIN ALTO (A) : 2,10
 OBSERVACIÓN 3 INTERVALO DE RESOLUCIÓN DE BIN BAJO (A) : 2,23
 OBSERVACIÓN 3 EXHAUSTIVIDAD DE BIN (TRABAJO+ENSAYO) (%) : 94,7
 OBSERVACIÓN 3 REFLEJOS EN BIN (CONJUNTO DE TRABAJO) : 4478
 OBSERVACIÓN 3 VALOR R DE BIN (CONJUNTO DE TRABAJO) : 0,201
 OBSERVACIÓN 3 VALOR R LIBRE DE BIN : 0,241
 OBSERVACIÓN 3 TAMAÑO DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE DE BIN (%) : 4,5
 OBSERVACIÓN 3 RECUENTO DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE DE BIN : 213
 OBSERVACIÓN 3 ERROR ESTIMADO DE VALOR R LIBRE DE BIN : 0,016
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 NÚMERO DE ÁTOMOS NO HIDROGENADOS USADOS EN EL REFINAMIENTO.
 OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS DE PROTEÍNA : 3311
 OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS DE ÁCIDO NUCLEICO : 0
 OBSERVACIÓN 3 HETEROÁTOMOS : 5
 OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS DE DISOLVENTE : 313
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 VALORES B.
 OBSERVACIÓN 3 DE DIAGRAMA DE WILSON (A**2) : 21,1
 OBSERVACIÓN 3 VALOR B MEDIO (GLOBAL, A**2) : 27,4
 OBSERVACIÓN 3 VALOR B ANISÓTROPO GLOBAL.
 OBSERVACIÓN 3 B11 (A**2) : -6,02
 OBSERVACIÓN 3 B22 (A**2) : 3,30
 OBSERVACIÓN 3 B33 (A**2) : 2,73
 OBSERVACIÓN 3 B12 (A**2) : 0,00
 OBSERVACIÓN 3 B13 (A**2) : 3,82
 OBSERVACIÓN 3 B23 (A**2) : 0,00
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 MODELADO DE DISOLVENTE VOLUMINOSO.
 OBSERVACIÓN 3 MÉTODO USADO : MODELO PLANO
 OBSERVACIÓN 3 KSOL : 0,399279
 OBSERVACIÓN 3 BSOL : 54,4727 (A**2)
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 ERROR DE COORDENADAS ESTIMADAS.
 OBSERVACIÓN 3 ESD DE DIAGRAMA DE LUZZATI (A) : 0,21
 OBSERVACIÓN 3 ESD DE SIGMAA (A) : 0,12
 OBSERVACIÓN 3 VALOR DE CORTE DE RESOLUCIÓN BAJA (A) : 5,00
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 ERROR DE COORDENADAS ESTIMADAS DE VALIDACIÓN CRUZADA.
 OBSERVACIÓN 3 ESD DE DIAGRAMA DE LUZZATI C-V (A) : 0,29
 OBSERVACIÓN 3 ESD DE SIGMAA C-V (A) : 0,14
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 DESVIACIONES DE RMS DE LOS VALORES IDEALES.
 OBSERVACIÓN 3 LONGITUDES DE ENLACE (A) : 0,004
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS DE ENLACE (GRADOS) : 0,9
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS DIÉDRICOS (GRADOS) : 21,4
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS INDEBIDOS (GRADOS) : 0,58

OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 MODELO TÉRMICO ISOTRÓPICO : RESTRINGIDO
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 RESTRICCIONES DE FACTOR TÉRMICO ISOTRÓPICO. RMS SIGMA
 OBSERVACIÓN 3 ENLACE DE CADENA PRINCIPAL (A**2) : 1,41 ; 1,50
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULO DE CADENA PRINCIPAL (A**2) : 2,21 ; 2,00
 OBSERVACIÓN 3 ENLACE DE CADENA LATERAL (A**2) : 2,31 ; 2,00
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULO DE CADENA LATERAL (A**2) : 3,44 ; 2,50
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 MODELO NCS : NINGUNO
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 RESTRICCIONES DE NCS. RMS SIGMA/PESO
 OBSERVACIÓN 3 GRUPO 1 POSICIONAL (A) : NULO ; NULO
 OBSERVACIÓN 3 GRUPO 1 FACTOR B (A**2) : NULO ; NULO
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE PARÁMETROS 1 : protein_rep.param
 OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE PARÁMETROS 2 : water_rep.param
 OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE TOPOLOGÍA 1 : protein_no_cter.top
 OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE TOPOLOGÍA 2 : water.top
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 OTRAS OBSERVACIONES DE REFINAMIENTO: NULO
 ENLACE DISULFURO 1 CYS L 23 CYS L 88
 ENLACE DISULFURO 2 CYS L 134 CYS L 194
 ENLACE DISULFURO 3 CYS H 22 CYS H 96
 ENLACE DISULFURO 4 CYS H 143 CYS H 199
 CRIST1 51,627 132,089 77,247 90,00 98,88 90,00 C 1 2 1 8
 ORIGX1 1,000000 0,000000 0,000000 0,000000
 ORIGX2 0,000000 1,000000 0,000000 0,000000
 ORIGX3 0,000000 0,000000 1,000000 0,000000
 ESCALA1 0,019370 0,000000 0,003027 0,000000
 ESCALA2 0,000000 0,007571 0,000000 0,000000
 ESCALA3 0,000000 0,000000 0,013103 0,000000

La figura 1 proporciona la estructura tridimensional del Fab XAB1 obtenida en el ejemplo 1. La figura 1A es una representación de relleno de espacios. La figura 1B es una representación de dibujos. La cadena pesada y ligera del Fab XAB1 aparecen en negro y gris claro, respectivamente.

5

Ejemplo 2. Estructura cristalina del complejo de Fv XAB1 con IL-17A humana: análisis del parátipo para maduración de la afinidad guiada por la estructura

(i) *Material y métodos*

10

Se usaron protocolos convencionales de biología molecular para obtener el fragmento de anticuerpo Fv XAB1. En resumen, se clonó el Fv y se expresó en *E. coli* W3110 con una marca de hexahistidina en el extremo C en la cadena pesada y una marca de estreptomycin en el extremo C en la cadena ligera. La proteína recombinante se purificó por cromatografía con quelato de Ni.

15

Entonces se preparó el complejo de fragmento Fv XAB1 con IL-17A humana usando metodología convencional. En resumen, se mezcló IL-17A humana (1,1 mg) con un exceso de Fv (2,7 mg) y el complejo se procesó en una cromatografía por exclusión de tamaño S100, en TRIS 10 mM pH 7,4, NaCl 25 mM. El complejo proteínico entonces se concentró por ultrafiltración a 21,2 mg/ml y se cristalizó.

20

Se siguieron protocolos convencionales de cristalización. En resumen, los cristales se hicieron crecer a 19 °C en placas de 96 pocillos de SD2, usando el método de difusión de vapor en gotas posadas. La solución madre de proteína se mezcló 1:1 con un tampón de cristalización que contenía PEG 20 000 al 10 %, Bicina 0,1 M pH 9,0, dioxano al 2,0 % (v/v). El tamaño de gota total fue de 0,4 µl. Antes de la recogida de datos de rayos X, se transfirió brevemente un cristal a una mezcla 1:1 del tampón de cristalización con PEG 20 000 al 20 %, glicerol al 30 % y después se enfrió de forma ultrarrápida en nitrógeno líquido.

25

La recogida de datos de rayos X y el procesamiento se realizaron usando protocolos convencionales. En resumen, se recogieron datos de rayos X a resolución de 3,0 Å en la Swiss Light Source, línea de luz X10SA, con un detector MAR225 CCD, usando radiación de rayos X de 1,0000 Å. En total, se registraron 110 imágenes de 1,0° de oscilación cada una a una distancia del cristal al detector de 300 mm y se procesaron con el paquete de programa informático HKL2000. El cristal pertenecía al grupo espacial P2₁2₁2 con los parámetros de celda a = 184,31 Å, b = 55,81 Å, c = 70,99 Å, α = β = γ = 90°. R-sym a resolución de 3,0 Å fue de un 11,2 % y la integridad de los datos de un 99,9 %.

30

La estructura se determinó por remplazo molecular con el programa PHASER. Se generó un modelo de búsqueda para el Fv XAB1 a partir de la estructura cristalina del Fab XAB1 previamente determinado (véase el ejemplo 1). Se generó un modelo de búsqueda para IL-17A a partir de la estructura cristalina de IL-17F humana publicada (PDB entrada 1jpy). Se realizó construcción iterativa de modelos y refinado con Coot (Crystallographic Object-Oriented Toolkit) y CNX (Crystallography & NMR eXplorer) versión 2002, hasta que no pudieron hacerse más mejoras significativas al modelo. R total y R libre para todos los datos fueron de 0,215 y 0,269, respectivamente. El modelo refinado final mostró una desviación de la media cuadrática (RMSD) de las longitudes de enlace y ángulos de enlace ideales de 0,007 Å y 1,0°, respectivamente.

(ii) *Resultados*

Los cálculos de remplazo molecular revelaron un complejo dimérico que comprendía un homodímero de IL-17A con dos fragmentos Fv XAB1 unidos. Los resultados del refinamiento de rayos X del complejo de Fv XAB1 con IL-17A humana se proporcionan en la tabla 10 y la estructura tridimensional de este complejo se muestra en la figura 2. Cada Fv XAB1 hace contactos con ambas subunidades de IL-17A, pero la inmensa mayoría de los contactos intermoleculares (aproximadamente un 96 % de la superficie enterrada) los aporta una subunidad de IL-17A únicamente.

Tabla 10. Refinamiento por rayos X del complejo de Fv XAB1 con IL-17A obtenido por el programa CNX.

OBSERVACIÓN	3	
OBSERVACIÓN	3	REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN	3	PROGRAMA : CNX 2002
OBSERVACIÓN	3	AUTORES : Brunger, Adams, Clore, Delano,
OBSERVACIÓN	3	Gros, Grosse-Kunstleve, Jiang,
OBSERVACIÓN	3	Kuszewski, Nilges, Pannu, Read,
OBSERVACIÓN	3	Rice, Simonson, Warren
OBSERVACIÓN	3	y
OBSERVACIÓN	3	Accelrys Inc.,
OBSERVACIÓN	3	(Badger, Berard, Kumar, Szalma,
OBSERVACIÓN	3	Yip, Dzakula).
OBSERVACIÓN	3	
OBSERVACIÓN	3	DATOS USADOS EN EL REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE RESOLUCIÓN ALTO (ANGSTROMS) : 3,01
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE RESOLUCIÓN BAJO (ANGSTROMS) : 47,74
OBSERVACIÓN	3	VALOR DE CORTE DE DATOS (SIGMA(F)) : 0,0
OBSERVACIÓN	3	VALOR DE CORTE DE DATOS ALTO (ABS(F)) : 15276175,80
OBSERVACIÓN	3	VALOR DE CORTE DE DATOS BAJO (ABS(F)) : 0,000000
OBSERVACIÓN	3	EXHAUSTIVIDAD (TRABAJO+ENSAYO) (%) : 99,5
OBSERVACIÓN	3	NÚMERO DE REFLEJOS : 15190
OBSERVACIÓN	3	
OBSERVACIÓN	3	AJUSTE A DATOS USADOS EN EL REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN	3	MÉTODO DE VALIDACIÓN CRUZADA : TOTALIDAD
OBSERVACIÓN	3	SELECCIÓN DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE : ALEATORIO
OBSERVACIÓN	3	VALOR R (CONJUNTO DE TRABAJO) : 0,215
OBSERVACIÓN	3	VALOR R LIBRE : 0,269
OBSERVACIÓN	3	TAMAÑO DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE (%) : 4,9
OBSERVACIÓN	3	RECuento DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE : 748
OBSERVACIÓN	3	ERROR ESTIMADO DE VALOR R LIBRE : 0,010
OBSERVACIÓN	3	
OBSERVACIÓN	3	AJUSTE EN EL BIN DE MÁXIMA RESOLUCIÓN.
OBSERVACIÓN	3	NÚMERO TOTAL DE BINS USADOS : 6
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE RESOLUCIÓN DE BIN ALTO (A) : 3,00
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE RESOLUCIÓN DE BIN BAJO (A) : 3,19
OBSERVACIÓN	3	EXHAUSTIVIDAD DE BIN (TRABAJO+ENSAYO) (%) : 94,6
OBSERVACIÓN	3	REFLEJOS EN BIN (CONJUNTO DE TRABAJO) : 2234
OBSERVACIÓN	3	VALOR R DE BIN (CONJUNTO DE TRABAJO) : 0,301
OBSERVACIÓN	3	VALOR R LIBRE DE BIN : 0,350
OBSERVACIÓN	3	TAMAÑO DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE DE BIN (%) : 5,3
OBSERVACIÓN	3	RECuento DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE DE BIN : 124
OBSERVACIÓN	3	ERROR ESTIMADO DE VALOR R LIBRE DE BIN : 0,031
OBSERVACIÓN	3	
OBSERVACIÓN	3	NÚMERO DE ÁTOMOS NO HIDROGENADOS USADOS EN EL REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN	3	ÁTOMOS DE PROTEÍNA : 5007
OBSERVACIÓN	3	ÁTOMOS DE ÁCIDO NUCLEICO : 0

ES 2 758 473 T3

```

OBSERVACIÓN 3 HETEROÁTOMOS      : 0
OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS DE DISOLVENTE      : 33
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 VALORES B.
OBSERVACIÓN 3 DE DIAGRAMA DE WILSON      (A**2) : 54,9
OBSERVACIÓN 3 VALOR B MEDIO      (GLOBAL, A**2) : 44,8
OBSERVACIÓN 3 VALOR B ANISÓTROPO GLOBAL.
OBSERVACIÓN 3 B11 (A**2) : 5,66
OBSERVACIÓN 3 B22 (A**2) : 0,97
OBSERVACIÓN 3 B33 (A**2) : -6,63
OBSERVACIÓN 3 B12 (A**2) : 0,00
OBSERVACIÓN 3 B13 (A**2) : 0,00
OBSERVACIÓN 3 B23 (A**2) : 0,00
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 MODELADO DE DISOLVENTE VOLUMINOSO.
OBSERVACIÓN 3 MÉTODO USADO : MODELO PLANO
OBSERVACIÓN 3 KSOL      : 0,313124
OBSERVACIÓN 3 BSOL      : 20,608 (A**2)
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 ERROR DE COORDENADAS ESTIMADAS.
OBSERVACIÓN 3 ESD DE DIAGRAMA DE LUZZATI      (A) : 0,33
OBSERVACIÓN 3 ESD DE SIGMA      (A) : 0,39
OBSERVACIÓN 3 VALOR DE CORTE DE RESOLUCIÓN BAJA      (A) : 5,00
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 ERROR DE COORDENADAS ESTIMADAS DE VALIDACIÓN CRUZADA.
OBSERVACIÓN 3 ESD DE DIAGRAMA DE LUZZATI C-V      (A) : 0,44
OBSERVACIÓN 3 ESD DE SIGMA C-V      (A) : 0,51
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 DESVIACIONES DE RMS DE LOS VALORES IDEALES.
OBSERVACIÓN 3 LONGITUDES DE ENLACE      (A) : 0,007
OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS DE ENLACE      (GRADOS) : 1,0
OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS DIÉDRICOS      (GRADOS) : 22,1
OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS INDEBIDOS      (GRADOS) : 0,78
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 MODELO TÉRMICO ISOTRÓPICO : RESTRINGIDO
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 RESTRICCIONES DE FACTOR TÉRMICO ISOTRÓPICO. RMS SIGMA
OBSERVACIÓN 3 ENLACE DE CADENA PRINCIPAL      (A**2) : 1,46 ; 1,50
OBSERVACIÓN 3 ÁNGULO DE CADENA PRINCIPAL      (A**2) : 2,62 ; 2,00
OBSERVACIÓN 3 ENLACE DE CADENA LATERAL      (A**2) : 1,63 ; 2,00
OBSERVACIÓN 3 ÁNGULO DE CADENA LATERAL      (A**2) : 2,62 ; 2,50
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 MODELO NCS : NINGUNO
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 RESTRICCIONES DE NCS. RMS SIGMA/PESO
OBSERVACIÓN 3 GRUPO 1 POSICIONAL      (A) : NULO ; NULO
OBSERVACIÓN 3 GRUPO 1 FACTOR B      (A**2) : NULO ; NULO
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE PARÁMETROS 1 : protein_rep.param
OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE PARÁMETROS 2 : water_rep.param
OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE TOPOLOGÍA 1 : protein_no_cter.top
OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE TOPOLOGÍA 2 : water.top
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 OTRAS OBSERVACIONES DE REFINAMIENTO: NULO
ENLACE DISULFURO 1 CYS L 23 CYS L 88
ENLACE DISULFURO 2 CYS H 22 CYS H 96
ENLACE DISULFURO 3 CYS A 23 CYS A 88
ENLACE DISULFURO 4 CYS B 22 CYS B 96
ENLACE DISULFURO 5 CYS C 94 CYS C 144
ENLACE DISULFURO 6 CYS C 99 CYS C 146
ENLACE DISULFURO 7 CYS D 94 CYS D 144
ENLACE DISULFURO 8 CYS D 99 CYS D 146
CRIST1 184,306 55,813 70,991 90,00 90,00 90,00 P 21 21 2 24
ORIGX1 1,000000 0,000000 0,000000 0,000000
ORIGX2 0,000000 1,000000 0,000000 0,000000

```

ORIGX3	0,000000	0,000000	1,000000	0,000000
ESCALA1	0,005426	0,000000	0,000000	0,000000
ESCALA2	0,000000	0,017917	0,000000	0,000000
ESCALA3	0,000000	0,000000	0,014086	0,000000

La figura 2 proporciona la estructura tridimensional del complejo de Fv XAB1 con IL-17A humana, que se obtiene en el ejemplo 2. La figura 2A muestra los dos fragmentos Fv XAB1 en representación de relleno de espacios; el homodímero de IL-17A se muestra en representación de dibujos. La figura 2B muestra los dos fragmentos Fv XAB1 en representación de dibujos; el homodímero de IL-17A se muestra en representación de relleno de espacios. La cadena pesada y ligera del Fv XAB1 se representan como negro y gris claro, respectivamente. Una cadena del homodímero de IL-17A se representa como gris claro, la otra se representa como gris oscuro.

Se realizó un análisis detallado del complejo. Se realizó una inspección visual meticulosa de la estructura cristalina con los programas Coot y Pymol, y se calculó la cantidad de superficie proteínica enterrada en la superficie de contacto entre el anticuerpo y el antígeno con el programa AREAIMOL del conjunto de programas CCP4. Los contactos intermoleculares se definieron usando una distancia de corte de 3,9 Å entre los átomos del anticuerpo y del antígeno. Puede resumirse una perspectiva general de la unión de la siguiente manera. La unión de XAB1 es simétrica; cada fragmento Fv se une a un epítipo equivalente en el homodímero de IL17A.

La unión de cada fragmento Fv enterraba un promedio de 1732 Å² de superficie combinada, e implicaba 30 restos aminoacídicos del anticuerpo y 25 de IL-17A. La contribución a la superficie enterrada de la cadena ligera de XAB1 (aproximadamente 560 Å²) fue mayor que la de la cadena pesada (aproximadamente 275 Å²). Además, CDRH2 no hacía ningún contacto directo con IL-17A y parecía estar demasiado lejos del antígeno proteínico para proporcionar oportunidades para la maduración de la afinidad. La contribución de CDRH1 parecía estar limitada a una cadena lateral de aminoácido únicamente (Tyr32); esta CDR estaba también demasiado lejos de IL-17A para ofrecer oportunidades para la maduración de la afinidad mediante sustituciones de aminoácido. La CDRH3 XAB1 hacía múltiples contactos compactos con IL-17A. Sin embargo, una inspección meticulosa de la estructura en esta región no consiguió revelar ninguna oportunidad para potenciación adicional de estos contactos mediante mutaciones puntuales; por lo tanto, CDRH3 se consideró inadecuada como región diana para potenciación de la afinidad. Por el contrario, la inspección de las CDR de la cadena ligera mostró múltiples oportunidades para la maduración de la afinidad. Entre las tres CDR de la cadena ligera, la CDRL1 se consideró la más prometedora y, basándose en esta observación, los autores de la invención propusieron aleatorizar las posiciones 30 a 32 de la cadena ligera en un intento por reforzar los contactos con los restos de IL-17A Arg124, Phe133 y Tyr85.

Maduración de la afinidad por diseño racional

Basándose en los resultados anteriores, se observó que la superficie de contacto de XAB1 con IL-17A homodimérica era comparativamente pequeña y se caracterizaba por una contribución dominante de la cadena ligera, sin implicación de CDRH2, y contribución principalmente indirecta de CDRH1 (es decir, mediante estabilización de CDRH3). Por consiguiente, la cadena pesada de XAB1 no parecía ofrecer oportunidades prometedoras para la maduración de la afinidad.

Por el contrario, la cadena ligera de XAB1 ofrecía algunas oportunidades en los restos aminoacídicos 30 a 32, con una inserción opcional de hasta 4 restos aminoacídicos (CDRL1), los aminoácidos 51 a 53 y 56 (CDRL2) y los restos aminoacídicos 92 y 93, con una inserción opcional de hasta 4 restos aminoacídicos.

La disponibilidad de la estructura cristalina publicada para IL-17F humana homodimérica, y la estructura de IL-17F homodimérica en complejo con el receptor IL-17RA humano permitió hacer predicciones basándose en las estructuras observadas de IL-17A cristalizada e IL-17A en complejo con XAB1 (y variantes del mismo).

Se investigaron las similitudes estructurales predichas entre IL-17F e IL-17A (basándose en la identidad y homología de secuencia). IL-17F y IL-17A guarda una semejanza estructural. Los autores de la invención elaboraron la hipótesis de que IL-17A se uniría al dominio del extremo N de su receptor de la misma manera que se ha mostrado para el complejo publicado de IL-17F/IL-17RA (Ely LK *et al.* 2009, Nat Immunol. 10:1245-51).

Basándose en la estructura observada y la comparación de las secuencias conocidas para IL-17A e IL-17F humana, junto con la secuencia de IL-17A derivada de otras especies, los autores de la invención hicieron varias predicciones adicionales:

Se esperaba que XAB1 (y anticuerpos variantes derivados de los mismos que tienen una afinidad mejorada por el epítipo diana de XAB1) fuera muy específico para IL-17A humana. Se elaboró la hipótesis de que dichos anticuerpos conservarían algo de reactividad cruzada con IL-17A de otras especies (basándose en el alto grado de identidad u homología de secuencia conservada entre las especies). Sin embargo, basándose en los datos de secuencia disponibles y las predicciones estructurales, no estaba claro el grado que podía esperarse de reactividad cruzada con

variantes de especie de IL-17A. Dada la ausencia de similitud estructural con otras interleucinas, se esperaba que la reactividad cruzada con dichas moléculas (de seres humanos u otras especies) fuera muy remota.

Además, las diferencias entre las secuencias de IL-17A e IL-17F (en particular la región del extremo N) dieron lugar a las predicciones de que los anticuerpos anti-IL-17A de la divulgación no se unirían a IL-17F. Por ejemplo, superposiciones de las dos estructuras cristalinas indicaron que la impedancia estérica evitaría la unión entre estos anticuerpos e IL-17F. Además, una extrapolación de la estructura de heterodímeros de IL-17AF también sugería que dicha interferencia, en particular en la región del extremo N, dificultaría la unión de los anticuerpos a heterodímeros de IL-17AF y de ese modo provocaría una ausencia de unión a IL-17AF, es decir, una ausencia de reactividad cruzada por parte de estos anticuerpos para heterodímeros de IL-17AF.

Ejemplo 3. Generación de variantes de anticuerpo de afinidad madurada

La maduración de la afinidad real del anticuerpo inicial XAB1 se centró en la cadena ligera, por las razones analizadas anteriormente. El trabajo se realizó en tres etapas: (i) generación de colección, (ii) cribado de la colección y (iii) caracterización de candidatos.

El trabajo de ingeniería de proteínas (es decir, maduración de la afinidad) se realizó en el formato de fragmento Fab para facilitar la manipulación. Los candidatos volvieron a ponerse en formato de IgG completa después de la manipulación.

(i) Generación de colección

La secuencia de ADN que codifica el dominio variable de la cadena ligera se mutó para crear una colección de variantes génicas. Se usaron dos estrategias diferentes (A y B) para la generación de la colección, proporcionando dos colecciones diferentes.

1) Método A - mutación aleatoria mediante PCR propensa a errores:

La región de ADN que codifica el dominio variable de la cadena ligera de XAB1 se mutó aleatoriamente usando PCR propensa a errores. En más detalles, esta región se amplificó usando la polimerasa Mutazyme II, que introducía mutaciones a una alta frecuencia (para más detalle, véanse las directrices aportadas con el kit de mutagénesis aleatoria GeneMorph II, aportado por Stratagene n.º 200550). Sin embargo, podría usarse cualquier técnica o estrategia adecuada de mutación aleatoria.

La combinación de variantes de fragmentos de PCR entonces se clonó por corte y pegado en el vector de expresión de XAB1. Esencialmente, la secuencia precursora sin mutar se cortó del vector de expresión y se reemplazó por una secuencia mutagenizada aleatoriamente que se pegó en su lugar. Se usaron técnicas convencionales de biología molecular para conseguir esto.

Esto produjo una colección de variantes del vector de expresión que comprenden una diversidad de secuencias del dominio variable mutagenizadas aleatoriamente.

2) Método B - mutación por diseño racional:

Bajo esta estrategia, la generación de la colección estuvo guiada por los análisis estructurales realizados como precursor para la maduración de la afinidad. Se abordaron restos aminoacídicos específicos (en particular en CDR1 de la cadena ligera de XAB1) basándose en la información de epítomos y parátomos obtenida de la estructura cristalina descrita anteriormente.

Se aleatorizaron completamente tres restos aminoacídicos, seleccionados basándose en la información de estructura cristalina. Se usaron estrategias convencionales de biología molecular para la construcción.

En primer lugar, un fragmento de la región variable que codifica la CDR apropiada y una primera parte de la región flanqueante de cadena ligera se amplificó por PCR, usando oligonucleótidos degenerados.

Es decir, los oligonucleótidos, que codifican la CDR se sintetizaron de tal manera para proporcionar una diversidad de bases en una posición o posiciones definidas. El diseño del oligonucleótido posibilitó la aleatorización de posiciones de aminoácidos específicamente abordadas en la CDR mediante codones degenerados NNK (en que N significa las 4 bases, A, T, C y G y K significa G y T) y permitió los 20 aminoácidos naturales en esas posiciones.

Después de esta primera etapa, un segundo fragmento que solapaba con el primero y que codifica la parte restante de la cadena ligera, también se amplificó por PCR. Ambos fragmentos entonces se ensamblaron mediante PCR de "ensamblaje" para generar la cadena ligera variable completa y se clonó de nuevo en el vector de expresión de una manera de "cortar y pegar". De este modo, la secuencia precursora se reemplazó con una serie de secuencias mutadas

de forma racional, por lo que estaban representados los 20 aminoácidos naturales en posiciones de aminoácidos específicas.

(ii) *Cribado de la colección*

5 Una vez se habían generado las colecciones que comprendían las secuencias que codifican las variantes de XAB1, fue necesario cribarlas para seleccionar aquellas que tuvieran características superiores a la secuencia de XAB1 precursora, por ejemplo, mayor afinidad por IL-17A.

10 Se usaron dos técnicas de cribado. En primer lugar, se hizo un cribado de alto rendimiento mediante "cribado por filtración de colonias" (CFS). Este ensayo permitió un cribado conveniente de un gran número de clones. Permitted la reducción a aciertos positivos antes del cribado por ELISA, que fue útil en particular para el "método A" de estrategia aleatoria ya que el tamaño de la colección era mucho mayor ($> 10^5$) en comparación con el tamaño de la colección del "método B" (únicamente 8000). El cribado por ELISA es conveniente para 10^4 clones o menos y da resultados más
15 cuantitativos.

1) Cribado por filtración de colonias (CFS):

El protocolo para CFS se basó en Skerra *et al.* 1991, Anal Biochem 196:151-155. Se hicieron algunas adaptaciones.

20 Se cultivaron colonias de *E. coli* que expresaban las colecciones de variantes de Fab en un filtro en la parte superior de una placa de Petri que contenía agar LB y glucosa. En paralelo, se recubrió una membrana de PVDF con la proteína diana (IL-17A). La membrana recubierta se puso sobre la placa de agar. El filtro con colonias de *E. coli* que expresan fragmentos Fab se puso en la parte superior de la membrana. Los fragmentos Fab expresados por las células
25 difundieron de las colonias y se unieron a IL-17A diana. El fragmento Fab así capturado en la membrana de PVDF entonces se detectó usando un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina para tinción de Western. Las condiciones para seleccionar únicamente variantes con propiedades de unión mejoradas se establecieron previamente usando XAB1 como referencia.

30 Más específicamente, después de la transformación de células de *E. coli* con la colección, las células se propagaron en un filtro de membrana Durapore™ (0,22 μm GV, Millipore®, cat n.º GVWP09050) colocada en una placa de Petri que contenía agar LB + glucosa al 1 % + antibiótico de interés. Las placas se incubaron durante una noche a 30 °C.

35 La membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore®, cat n.º IPVH08100) se prehumedeció en metanol, se lavó en PBS y se recubrió con una solución de huIL-17A a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS. La membrana se incubó durante una noche a temperatura ambiente. Después del recubrimiento, la membrana se lavó 2 veces en solución salina tamponada con Tris (TBS) + Tween al 0,05 % (TBST) y se bloqueó dos horas a temperatura ambiente en TBST con leche al 5 %. Después, la membrana se lavó cuatro veces en TBST y se remojó en medio 2xYT con IPTG 1 mM. Esta membrana,
40 llamada la membrana de captura se puso en una placa de agar LB con IPTG 1 mM + antibiótico de interés, y se cubrió con la membrana Durapore con las colonias en la parte superior. El emparedado resultante se incubó cuatro horas a 30 °C.

Después de esta incubación, la membrana de captura se lavó 4 veces con TBST y se bloqueó en TBST con leche al 5 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, la membrana se lavó una vez con TBST y se incubó con un anticuerpo secundario (anticuerpo anticadena ligera kappa_hu, conjugado con fosfatasa alcalina (AP), Sigma n.º
45 A3813, diluido 1:5000 en TBST con leche al 2 %), 1 hora a temperatura ambiente. Después de ello, la membrana se lavó 4 veces en TBST, una vez en TBS y se incubó en la solución de sustrato (comprimido SigmaFast BCIP/NBT, 1 comprimido en 10 ml de H₂O). Cuando la señal alcanzó la intensidad esperada, la membrana se lavó con agua y se dejó secar.

50 Después del desarrollo de la señal en la membrana de captura, las colonias que daban señal más fuerte que el XAB1 precursor se cogieron y se dejó que continuaran a un cribado por ELISA secundario descrito a continuación.

2) Cribado por ELISA:

55 Después del CFS, se usó ELISA para cribar los candidatos seleccionados por CFS. En resumen, para el bajo número relativo de variantes identificado por mutagénesis por PCR propensa a errores (es decir, colección A) el ELISA se realizó manualmente en un formato de 96 pocillos. Por el contrario, para las colecciones construidas mediante diseño racional (método B), tuvo que cribarse un número mayor de clones mejorados a nivel de ELISA para poder discriminar
60 entre sus diferentes afinidades de unión por IL-17A e identificar los clones con la afinidad más alta. Se usó un robot de ELISA para ese fin en un formato de placa de 384 pocillos. Sin embargo, el protocolo de ELISA fue el mismo en cada caso, siendo la única diferencia los volúmenes de reactivos.

a) Cultivos celulares:

En primer lugar los clones se cultivaron durante una noche a 30 °C, 900 rpm, en medio 2xYT + glucosa al 1 % + antibiótico de interés. Las placas que contenían estos cultivos se denominaron placas fundamentales. El siguiente día, se transfirieron alícuotas de cultivos de las placas fundamentales a placas de expresión que contenían medio 2xYT + glucosa al 0,1 % + antibiótico de interés. Estas placas se incubaron a 30 °C, 900 rpm aproximadamente 3 horas. Después se añadió solución de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 0,5 mM. Las placas se incubaron durante una noche a 30 °C, 990 rpm.

El siguiente día, se añadió solución de tampón de lisis (2 x) solución salina tamponada con borato (BBS) (Teknova n.º B0205) + 2,5 mg/ml de lisozima + 10 u/ml de Benzonase) a los cultivos. Las placas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente, después se añadió TBST con leche al 12,5 % para el bloqueo. Después de 30 min de incubación, los lisados celulares se diluyeron 1:10 en TBST con leche al 2 % y se transfirieron a las placas de ELISA.

b) ELISA:

Las placas de ELISA (Nunc Maxisorp) se recubrieron con una solución de hUL-17A a 1 µg/ml durante 1 hora. Las placas se lavaron una vez con TBST y se bloquearon 1 hora con TBST con leche al 5 %. Después del bloqueo, las placas se lavaron 3 veces con TBST y, después, se cargaron lisados celulares diluidos en las placas y se incubaron 1 hora. Después de ello, las placas se lavaron 3 veces con TBST y se incubaron 1 hora con un anticuerpo secundario conjugado con AP.

Las placas finalmente se lavaron 3 veces con TBST y después se incubaron con la solución de sustrato (conjunto de sustrato AttoPhos, Roche n.º 11 681 982 001). El proceso completo se realizó a temperatura ambiente.

Además del ELISA "clásico" descrito anteriormente, también se emprendió un ELISA modificado para una mejor discriminación entre clones con afinidad muy alta (en el intervalo picomolar) por la proteína diana. Se desarrollaron un ELISA de "velocidad de disociación" y un ELISA de "competición" para este fin, como se describe a continuación.

c) ELISA de "velocidad de disociación":

Para este ensayo, la modificación en comparación con el protocolo de ELISA "clásico" contemplaba la etapa de lavado después de la etapa de unión (incubación de lisado celular en placas de ELISA). En el protocolo "clásico", la placa se lavó 3 veces con TBST. La solución de lavado se distribuyó y se aspiró inmediatamente, sin ningún tiempo de incubación. Para el ELISA de "velocidad de disociación", la placa se lavó 6 veces durante al menos 3 horas. Este largo lavado aumentó la rigurosidad del ensayo, y permitió identificar clones con una lenta velocidad de disociación.

d) ELISA de "competición":

Este protocolo de ELISA modificado incluía una etapa adicional después de la etapa de unión. Después de incubación del lisado celular, las placas se lavaron 3 veces con TBST y, después, una solución del XAB1 precursor (200 nM en TBST con leche al 2 %) se incubó durante una noche a temperatura ambiente. Esta larga de incubación con un exceso del Fab precursor permitió, como en el caso de ELISA de "velocidad de disociación", identificar clones con velocidad de disociación lenta, que dio lugar a una mejor discriminación entre clones con una afinidad en el intervalo picomolar. El resto del protocolo fue similar al protocolo de ELISA "clásico". El anticuerpo secundario usado en este caso fue un anticuerpo antimarca Flag conjugado con AP, ya que los Fab variantes de la colección tenían una marca Flag en el extremo C de la cadena pesada, pero no el Fab XAB1 precursor usado para la competición.

(iii) Caracterización de candidatos

Estos aceritos identificados durante el cribado se produjeron a una mayor escala para caracterización fisicoquímica adicional y para confirmar una unión de alta afinidad a IL-17A, y/u otras propiedades ventajosas en ensayos adicionales. Estos se describen a continuación en mayor detalle.

*(iv) Resultados: Cribado y caracterización inicial de candidatos después de maduración de la afinidad de XAB1***1) Estrategia de mutagénesis aleatoria (método A):**

Se descubrió que la tasa de mutación después de la generación de colección por PCR propensa a errores alcanzaba su punto máximo en 2 a 3 mutaciones por gen. Se cribaron aproximadamente 3×10^4 clones por cribado por filtración de colonias y se identificó un número de 94 clones como mejorados y se permitió que continuaran a ELISA de unión, de velocidad de disociación y competición. Los datos de ELISA en combinación con los resultados de secuenciación dieron lugar a la identificación de 6 candidatos que ponen de relieve 3 posibles puntos calientes para mejora, Gly en

la posición 28 a Val (G28V) en LCDR1; Gly en la posición 66 a Val (G66V) o Ser (G66S) en la región flanqueante 3; Asn92 a Asp (N92D) en LCDR3 (datos no mostrados, pero la colocación es idéntica a la de XAB2, VL, es decir la SEQ ID NO: 25).

Se observó un codón de parada en uno de los clones, pero no fue pertinente ya que la cepa de *E. coli* usada era una cepa supresora ámbar que permite la ultralectura. Basándose en los datos obtenidos, parecía que una mutación G28V y G66V causaba la mejor mejora. Se generó una variante de XAB1 por técnicas convencionales de biología molecular, que portaba las dos mutaciones puntuales mencionadas. Se clonó una variante adicional que tenía además la sustitución N92D, para ensayar si la eliminación del posible sitio de desamidación postraducciona (N92, S93) sería beneficioso. Se hizo un perfilado más detallado en esas dos variantes, en particular de la variante mutante triple denominada XAB_A2 que finalmente dio lugar a XAB2. En XAB2, los aminoácidos número 1 a 23 de acuerdo con la definición de Kabat constituyen la región flanqueante 1, los aminoácidos número 24 a 34 (Kabat) constituyen LCDR1, los aminoácidos número 35 a 49 (Kabat) constituyen la región flanqueante 2, los aminoácidos 50 a 56 (Kabat) constituyen LCDR2, los aminoácidos 57 a 88 (Kabat) constituyen la región flanqueante 3, los aminoácidos 89 a 97 (Kabat) constituyen LCDR3 y los aminoácidos 98 a 107 (Kabat) constituyen la región flanqueante 4. También se aplica la misma subdivisión de otras secuencias de VL de acuerdo con realizaciones de la divulgación.

Por tanto, la sustitución G66V mencionada anteriormente está en una región flanqueante, que se denomina bucle externo. Esta región flanqueante puede contribuir a la unión en algunos casos. Basándose en la información estructural disponible, se sugirió de forma retrospectiva que esta mutación, de hecho, podría interactuar con una región de IL-17A que no puede resolverse a partir de la estructura cristalina, pero puede estar en proximidad al bucle externo.

2) Estrategia de mutagénesis racional (método B):

Se generó una panorámica de la distribución de aminoácidos en las posiciones aleatorizadas secuenciando 32 miembros cogidos aleatoriamente. No hubo sesgo significativo, aunque no pudieron hacerse cálculos estadísticos con este bajo número de secuencias. Se cribaron aproximadamente 4×10^4 clones que sobremuestran el tamaño teórico de 8000 de la colección. Se identificó un elevado número de aciertos y se permitió que 2630 clones continuaran al cribado por ELISA. Realizando ELISA de unión, de velocidad de disociación y de competición, se secuenciaron 60 clones con las mejoras más elevadas. En esos 60 clones se encontraron 22 secuencias únicas, y el resultado se resume en la tabla 11.

Tabla 11. ELISA de los 22 candidatos únicos seleccionados. Los valores se normalizan al Fab XAB1 precursor. La representación indica lo frecuentemente que una determinada secuencia se encontraba dentro de los 60 aciertos. La diferencia en la secuencia de aminoácidos se da en las tres últimas columnas. XAB1 tiene los aminoácidos I S A en esas posiciones. Señales de ELISA determinadas a partir de extracto en bruto de cultivo de expresión de Fab de *E. coli*.

Nombre del candidato	ELISA clásico	ELISA de velocidad de disociación	ELISA de competición	% de representación	30	31	32
MB491	2,1	43,0	44,2	5	F	F	W
MB483	3,1	47,1	45,2	2	F	W	T
MB447	3,0	45,5	57,0	5	F	W	W
MB457	2,7	34,7	41,0	5	I	W	S
MB464	2,7	34,9	36,9	7	I	Y	C
MB432	2,3	44,2	37,3	12	L	F	A
MB454	2,9	34,2	36,6	2	L	W	A
MB444	3,2	48,9	52,4	2	L	W	E
MB456	2,4	45,1	46,7	2	L	W	H
MB440	2,8	52,5	54,0	5	L	W	C
MB450	2,9	41,5	53,3	5	M	W	W
MB435	2,7	44,7	44,6	2	N	W	E
MB438	2,7	41,5	41,1	7	P	Y	A
MB453	2,7	43,3	46,4	9	V	F	W
MB448	2,9	40,4	51,5	5	V	W	M
MB486	1,9	58,5	64,9	2	W	W	M

MB434	2,4	44,4	39,5	7	W	W	Y
MB458	2,7	33,0	42,1	5	W	Y	C
MB463	2,7	34,2	31,6	2	Y	F	E
MB468	2,8	43,9	60,0	5	Y	W	E
MB433	2,3	39,7	29,3	2	Y	W	G
MB461	2,9	49,8	62,8	2	Y	W	T

De los 22 clones únicos, 6 se seleccionaron para expresión convencional a escala de 0,5 l en *E. coli* y purificación de dos etapas por IMAC (Ni-NTA) y SEC. Los Fab purificados entonces se usaron para confirmar la mejora en la unión por ELISA.

5 Los resultados de ELISA de los candidatos de Fab seleccionados y purificados en comparación con XAB1 se muestran en la figura 3, donde la numeración del gráfico corresponde a la denominación de candidatos de la siguiente manera: 1 es MB440; 2 es MB464; 3 es MB468; 4 es MB444; 5 es MB435; 6 es MB463; 7 es XAB1.

10 La figura 3A es un gráfico que muestra la señal normalizada frente a la concentración de Fab (M). Puede observarse que todos los clones seleccionados producían una señal mayor que XAB1. La figura 3B es un gráfico que muestra la señal remanente normalizada frente al tiempo de incubación de lavado (horas). Todos los clones seleccionados producen una señal mayor que XAB1. La figura 3C es un gráfico que muestra la señal normalizada frente a la concentración de competidor Fab (M). De nuevo, puede observarse que todos los clones seleccionados producen una
15 señal mayor que XAB1.

Ejemplo 4. Focalización en un posible sitio de desamidación postraducciona.

20 Los autores de la invención formularon la hipótesis de que el motivo de aminoácidos de asparagina seguida de glicina (NG) o, en menor medida, también cuando va seguida de serina (NS), puede ser susceptible a desamidación postraducciona. Dichos motivos están presentes en L-CDR2 (posición 56/57) y L-CDR3 (92/93) del anticuerpos XAB1. Se generaron cuatro variantes de IgG para ensayar si el sitio NG podría eliminarse sin afectar a las propiedades de unión y actividad. Estas cuatro variantes de mutación puntual se clonaron por procedimientos convencionales de biología molecular y se produjeron mediante transfección transitoria convencional de células HEK a escala de 100 ml
25 y se purificaron mediante una columna de proteína A.

Se analizaron variantes de IgG purificadas en un ensayo de neutralización *in vitro* (por ejemplo, como se describe en los ejemplos 12 y 13) para comparar su actividad con la IgG XAB1 precursora. Los resultados mostraron que de estas cuatro variantes, tres tenían una actividad reducida. Pero el candidato XAB_B12 (mutación N56Q) retenía la actividad
30 en comparación con el XAB1 precursor.

Tabla 12. Resumen general de modificaciones de secuencia en XAB1, y efecto correspondiente sobre neutralización *in vitro*.

CDR de Kabat	Resto n.º	49	L-CDR2								57	CI50 (nM)	
			50	51	52	53	54	55	56	Hu IL-6 sec		Hu IL-8 sec	
Kabat n.º	49	50	51	52	53	54	55	56	57				
<i>Variantes de IgG</i>	<i>Nombre genérico</i>												
XAB1	XAB1	Y	D	A	S	S	L	E	N	G	4	3	
XAB_G57T	XAB_A6	Y	D	A	S	S	L	E	N	T	22	23	
XAB_N56Q	XAB_B12	Y	D	A	S	S	L	E	C	G	2	3	
XAB_N56T	XAB_B13	Y	D	A	S	S	L	E	T	G	11	15	
XAB_N56S	XAB_B14	Y	D	A	S	S	L	E	S	G	13	17	

35 Habiendo identificado así la sustitución más adecuada, se introdujo en los aciertos más prometedores identificados durante el proceso de maduración de la afinidad, produciendo XAB2 (XAB_A2 N56Q), XAB3 (MB468 N56Q), XAB4 (MB435 N56Q). Se produjeron por transfección transitoria convencional de células HEK y se purificaron mediante columna de proteína A junto con XAB5 (MB435), que aún portaba el sitio NG.

40 El motivo NG se retiró (N56Q) para XAB2, XAB3, XAB4, pero aún estaba presente en XAB5. El motivo NS en L-CDR3 se retiró (N92D) en XAB2, como se encuentra durante la estrategia aleatoria de maduración de la afinidad. Por lo

tanto, estaba disponible un conjunto óptimo de variantes para ensayar la susceptibilidad a desamidación de los posibles sitios.

5 Los cuatro candidatos purificados se diluyeron en un tampón pH 8 y se incubaron a 40 °C para forzar la reacción de desamidación. Se cogieron alícuotas en varios puntos temporales para determinar el grado de desamidación mediante cromatografía de intercambio catiónico (CEX), de acuerdo con principios bien conocidos por los expertos en la materia, y se determinó la actividad de neutralización *in vitro* mediante un ensayo celular (por ejemplo, como se describe en los ejemplos 12 y 13).

10 Los resultados de CEX mostraron un aumento en el porcentaje de variantes ácidas a lo largo del tiempo, como se esperaba para cualquier IgG, probablemente debido a sitios de modificación postraduccional en la región flanqueante del anticuerpo, pero el grado de aumento fue mayor para XAB5 que para los otros candidatos, es decir, un 72 % frente a un 46 % después de una semana y un 94 % frente a un 83 % después de 4 semanas. Finalmente, los resultados del ensayo de actividad de neutralización *in vitro* se correlacionaron con los resultados de CEX, lo que muestra que XAB5 perdía actividad después de 4 semanas de incubación durante condiciones forzadas de desamidación. Se usó metodología de cromatografía por exclusión de tamaño-dispersión de luz a múltiples ángulos (SEC-MALS), bien conocida por los expertos en la materia, para controlar los niveles de agregación en las muestras.

Los datos se resumen en la tabla 13.

20

Tabla 13. Análisis por SEC-MALS, actividad de neutralización *in vitro* y CEX.

Anti cuerpo	M ^{a)} [%]	CE ₅₀ ^{b)} [ng/ml]	CEX ^{c)} [%]	M ^{a)} [%]	CE ₅₀ ^{b)} [ng/ml]	CEX ^{c)} [%]
			T = 0 semanas			
XAB2	99	45	15	98	n.d.	45
XAB3	99	40	14	98	n.d.	44
XAB5	99	45	18	98	n.d.	72
XAB4	99	48	15	98	n.d.	48
			T = 1 semanas			
			sitios NG ^{d)} sitios NS ^{d)}			
			T = 4 semanas			
XAB2	95	47	85	0	0	
XAB3	97	40	81	0	1	
XAB5	94	61	94	1	1	
XAB4	94	47	84	0	1	

^{a)}monómero por SEC-MALS, ^{b)} inhibición de la secreción de IL-6 después de estimulación celular con 80 ng/ml de IL-17, ^{c)}variantes ácidas por cromatografía de intercambio, ^{d)}número de sitios en CDR (región flanqueante no considerada)

25

Estos datos indicaron eliminación satisfactoria de un posible sitio de desamidación postraduccional, que podría haber tenido un efecto sobre la actividad del anticuerpo. Esto es ventajoso, ya que XAB2, XAB3 y XAB4, por lo tanto, tienen probabilidad de conseguir un producto más homogéneo que XAB1 ya que no se produce desamidación postraduccional durante la producción o almacenamiento que afecte a la actividad del anticuerpo.

30

Ejemplo 5. Análisis de rayos X de variantes de anticuerpo derivadas por maduración de la afinidad: XAB2

En resumen, se clonó el Fv XAB2 y se expresó en *E. coli* TGf1 con una marca de hexahistidina en el extremo C en la cadena pesada y una marca de estreptomycin en el extremo C en la cadena ligera, de acuerdo con principios bien conocidos por los expertos en la materia. La proteína recombinante se purificó por cromatografía con quelato de Ni y cromatografía por exclusión de tamaño (SPX-75).

35

Entonces se preparó el complejo de fragmento Fv XAB2 con IL-17A humana usando metodología convencional. En resumen, se mezcló IL-17A humana (1,5 mg) con un exceso de Fv XAB2 (3,7 mg) y el complejo se procesó en una cromatografía por exclusión de tamaño S100, en TRIS 10 mM pH 7,4, NaCl 25 mM. El complejo proteínico entonces se concentró por ultrafiltración a 26,3 mg/ml y se cristalizó.

40

Se siguieron protocolos convencionales de cristalización. En resumen, los cristales se hicieron crecer a 19 °C en placas de 96 pocillos de SD2, usando el método de difusión de vapor en gotas posadas. La solución madre de proteína se mezcló 1:1 con un tampón de cristalización que contenía acetato de calcio 0,2 M, PEG 3350 al 20 %. El tamaño de gota total fue de 0,4 µl. Antes de la recogida de datos de rayos X, se transfirió brevemente un cristal a una mezcla 1:1 del tampón de cristalización con PEG 3350 al 30%, glicerol al 30 % y después se enfrió de forma ultrarrápida en nitrógeno líquido.

45

La recogida de datos de rayos X y el procesamiento se realizaron usando protocolos convencionales. En resumen, se recogieron datos de rayos X a resolución de 2,0 Å en la Swiss Light Source, línea de luz X06DA, con un detector

50

MAR225 CCD, usando radiación de rayos X de 1,0000 Å. En total, se registraron 360 imágenes de 0,5° de oscilación cada una a una distancia del cristal al detector de 190 mm y se procesaron con el paquete de programa informático XDS. El cristal pertenecía al grupo espacial P2₁2₁2 con los parámetros de celda a = 184,72 Å, b = 55,56 Å, c = 71,11 Å, α = β = γ = 90°. R-sym a resolución de 2,0 Å fue de un 5,2 % y la integridad de los datos de un 100,0 %.

5 Como el cristal del complejo de Fv XAB2 era muy isomorfo con el cristal del complejo de Fv XAB1 (ejemplo 2), la estructura del último se usó como modelo de entrada para una ejecución inicial de refinamiento cristalográfico con el programa CNX. Se realizó corrección iterativa de modelos y refinado con Coot (Crystallographic Object-Oriented Toolkit) y CNX (Crystallography & NMR eXplorer) versión 2002, hasta que no pudieron hacerse más mejoras
10 significativas al modelo cristalográfico. R total y R libre para todos los datos fueron de 0,214 y 0,259, respectivamente. El modelo refinado final mostró una desviación de la media cuadrática (RMSD) de las longitudes de enlace y ángulos de enlace ideales de 0,005 Å y 0,9°, respectivamente.

Resultados

15 Los resultados del refinamiento de rayos X del complejo de Fv XAB2 con IL-17A humana se proporcionan en la tabla 14 y la estructura tridimensional de este complejo se muestra en la figura 4. El análisis de cristalografía de rayos X confirmó que el anticuerpo variante XAB2 retenía la especificidad de diana y se unía con alta afinidad a esencialmente el mismo epítipo que el anticuerpo XAB1 precursor. Sin embargo, en la estructura del complejo de XAB1, el bucle de la cadena ligera que comprende Gly66 adopta una conformación que ya no es posible cuando este resto se muta a una valina. Como consecuencia, en el complejo de XAB2, la mutación de Gly66 a valina (G66V) fuerza al bucle a adoptar una nueva conformación, y la cadena lateral de valina hace contactos hidrófobos con Ile51 de IL-17A (figura 5). Dos restos más de IL-17A, Pro42 y Arg43, llegan a ser visibles (ordenados) en esta estructura cristalina. Estos restos antigénicos hacen interacciones de unión adicionales con el anticuerpo XAB2, en particular contactos hidrófobos con Val28 (figura 5).
20
25

Tabla 14. Refinamiento por rayos X del complejo de Fv XAB2 con IL-17A obtenido por el programa CNX.

OBSERVACIÓN	3	
OBSERVACIÓN	3	REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN	3	PROGRAMA : CNX 2002
OBSERVACIÓN	3	AUTORES : Brunger, Adams, Clore, Delano,
OBSERVACIÓN	3	Gros, Grosse-Kunstleve, Jiang,
OBSERVACIÓN	3	Kuszewski, Nilges, Pannu, Read,
OBSERVACIÓN	3	Rice, Simonson, Warren
OBSERVACIÓN	3	y
OBSERVACIÓN	3	Accelrys Inc.,
OBSERVACIÓN	3	(Badger, Berard, Kumar, Szalma,
OBSERVACIÓN	3	Yip, Dzakula).
OBSERVACIÓN	3	
OBSERVACIÓN	3	DATOS USADOS EN EL REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE RESOLUCIÓN ALTO (ANGSTROMS) : 2,00
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE RESOLUCIÓN BAJO (ANGSTROMS) : 71,11
OBSERVACIÓN	3	VALOR DE CORTE DE DATOS (SIGMA(F)) : 0,0
OBSERVACIÓN	3	VALOR DE CORTE DE DATOS ALTO (ABS(F)) : 2329350,20
OBSERVACIÓN	3	VALOR DE CORTE DE DATOS BAJO (ABS(F)) : 0,000000
OBSERVACIÓN	3	EXHAUSTIVIDAD (TRABAJO+ENSAYO) (%) : 99,8
OBSERVACIÓN	3	NÚMERO DE REFLEJOS : 50409
OBSERVACIÓN	3	
OBSERVACIÓN	3	AJUSTE A DATOS USADOS EN EL REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN	3	MÉTODO DE VALIDACIÓN CRUZADA : TOTALIDAD
OBSERVACIÓN	3	SELECCIÓN DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE : ALEATORIO
OBSERVACIÓN	3	VALOR R (CONJUNTO DE TRABAJO) : 0,214
OBSERVACIÓN	3	VALOR R LIBRE : 0,259
OBSERVACIÓN	3	TAMAÑO DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE (%) : 5,0
OBSERVACIÓN	3	RECuento DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE : 2521
OBSERVACIÓN	3	ERROR ESTIMADO DE VALOR R LIBRE : 0,005
OBSERVACIÓN	3	
OBSERVACIÓN	3	AJUSTE EN EL BIN DE MÁXIMA RESOLUCIÓN.
OBSERVACIÓN	3	NÚMERO TOTAL DE BINS USADOS : 6
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE RESOLUCIÓN DE BIN ALTO (A) : 2,00
OBSERVACIÓN	3	INTERVALO DE RESOLUCIÓN DE BIN BAJO (A) : 2,13
OBSERVACIÓN	3	EXHAUSTIVIDAD DE BIN (TRABAJO+ENSAYO) (%) : 100,0
OBSERVACIÓN	3	REFLEJOS EN BIN (CONJUNTO DE TRABAJO) : 7858
OBSERVACIÓN	3	VALOR R DE BIN (CONJUNTO DE TRABAJO) : 0,262
OBSERVACIÓN	3	VALOR R LIBRE DE BIN : 0,304

ES 2 758 473 T3

OBSERVACIÓN 3 TAMAÑO DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE DE BIN (%) : 5,0
 OBSERVACIÓN 3 RECUENTO DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE DE BIN : 414
 OBSERVACIÓN 3 ERROR ESTIMADO DE VALOR R LIBRE DE BIN : 0,015
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 NÚMERO DE ÁTOMOS NO HIDROGENADOS USADOS EN EL REFINAMIENTO.
 OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS DE PROTEÍNA : 5055
 OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS DE ÁCIDO NUCLEICO : 0
 OBSERVACIÓN 3 HETEROÁTOMOS : 0
 OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS DE DISOLVENTE : 376
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 VALORES B.
 OBSERVACIÓN 3 DE DIAGRAMA DE WILSON (A**2) : 27,8
 OBSERVACIÓN 3 VALOR B MEDIO (GLOBAL, A**2) : 37,3
 OBSERVACIÓN 3 VALOR B ANISÓTROPO GLOBAL.
 OBSERVACIÓN 3 B11 (A**2) : -0,85
 OBSERVACIÓN 3 B22 (A**2) : 3,93
 OBSERVACIÓN 3 B33 (A**2) : -3,08
 OBSERVACIÓN 3 B12 (A**2) : 0,00
 OBSERVACIÓN 3 B13 (A**2) : 0,00
 OBSERVACIÓN 3 B23 (A**2) : 0,00
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 MODELADO DE DISOLVENTE VOLUMINOSO.
 OBSERVACIÓN 3 MÉTODO USADO : MODELO PLANO
 OBSERVACIÓN 3 KSOL : 0,338594
 OBSERVACIÓN 3 BSOL : 46,0594 (A**2)
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 ERROR DE COORDENADAS ESTIMADAS.
 OBSERVACIÓN 3 ESD DE DIAGRAMA DE LUZZATI (A) : 0,25
 OBSERVACIÓN 3 ESD DE SIGMA (A) : 0,19
 OBSERVACIÓN 3 VALOR DE CORTE DE RESOLUCIÓN BAJA (A) : 5,00
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 ERROR DE COORDENADAS ESTIMADAS DE VALIDACIÓN CRUZADA.
 OBSERVACIÓN 3 ESD DE DIAGRAMA DE LUZZATI C-V (A) : 0,31
 OBSERVACIÓN 3 ESD DE SIGMA C-V (A) : 0,22
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 DESVIACIONES DE RMS DE LOS VALORES IDEALES.
 OBSERVACIÓN 3 LONGITUDES DE ENLACE (A) : 0,005
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS DE ENLACE (GRADOS) : 0,9
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS DIÉDRICOS (GRADOS) : 21,0
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS INDEBIDOS (GRADOS) : 0,70
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 MODELO TÉRMICO ISOTRÓPICO : RESTRINGIDO
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 RESTRICCIONES DE FACTOR TÉRMICO ISOTRÓPICO. RMS SIGMA
 OBSERVACIÓN 3 ENLACE DE CADENA PRINCIPAL (A**2) : 1,49 ; 1,50
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULO DE CADENA PRINCIPAL (A**2) : 2,44 ; 2,00
 OBSERVACIÓN 3 ENLACE DE CADENA LATERAL (A**2) : 1,95 ; 2,00
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULO DE CADENA LATERAL (A**2) : 2,93 ; 2,50
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 MODELO NCS : NINGUNO
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 RESTRICCIONES DE NCS. RMS SIGMA/PESO
 OBSERVACIÓN 3 GRUPO 1 POSICIONAL (A) : NULO ; NULO
 OBSERVACIÓN 3 GRUPO 1 FACTOR B (A**2) : NULO ; NULO
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE PARÁMETROS 1 : protein_rep.param
 OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE PARÁMETROS 2 : water_rep.param
 OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE PARÁMETROS 3 : ion.param
 OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE TOPOLOGÍA 1 : protein.top
 OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE TOPOLOGÍA 2 : water.top
 OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE TOPOLOGÍA 4 : ion.top
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 OTRAS OBSERVACIONES DE REFINAMIENTO: NULO
 ENLACE DISULFURO 1 CYS L 23 CYS L 88
 ENLACE DISULFURO 2 CYS H 22 CYS H 96

ENLACE DISULFURO	3	CYS A	23	CYS A	88		
ENLACE DISULFURO	4	CYS B	22	CYS B	96		
ENLACE DISULFURO	5	CYS C	94	CYS C	144		
ENLACE DISULFURO	6	CYS C	99	CYS C	146		
ENLACE DISULFURO	7	CYS D	94	CYS D	144		
ENLACE DISULFURO	8	CYS D	99	CYS D	146		
CRIST1	184,719	55,558	71,109	90,00	90,00	90,00	P 21 21 2 24
ORIGX1	1,000000	0,000000	0,000000	0,000000			
ORIGX2	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000			
ORIGX3	0,000000	0,000000	1,000000	0,000000			
ESCALA1	0,005414	0,000000	0,000000	0,000000			
ESCALA2	0,000000	0,017999	0,000000	0,000000			
ESCALA3	0,000000	0,000000	0,014063	0,000000			

5 La figura 4 proporciona la estructura tridimensional del complejo de Fv XAB2 con IL-17A humana. La figura 4A muestra los dos fragmentos Fv XAB2 en representación de relleno de espacios y el homodímero de IL-17A se muestra en representación de dibujos. La figura 4B muestra los dos fragmentos Fv XAB2 en representación de dibujos y el homodímero de IL-17A se muestra en representación de relleno de espacios. La cadena pesada y ligera del Fv XAB2 se muestran en negro y gris claro, respectivamente. Una cadena del homodímero de IL-17A se muestra en gris claro, la otra se muestra en gris oscuro.

10 La figura 5 proporciona la estructura tridimensional del complejo de Fv XAB2 con IL-17A humana como una vista en primer plano de la L-CDR1 del anticuerpo y las regiones de bucle externo, que albergan las mutaciones de glicina a valina (G28V y G66V, respectivamente). La mutación G66V da lugar a un cambio en la conformación del bucle externo, así como a contactos adicionales de anticuerpo-antígeno con los restos de IL-17A Pro42, Arg43 e Ile51. El Fv XAB2 se representa en dibujos de color gris claro, y el homodímero de IL-17A humana en sombras más oscuras de gris. Ile51 no pertenece a la misma subunidad de IL-17A que Pro42 y Arg43.

15 **Ejemplo 6. Análisis de rayos X de variantes de anticuerpo derivadas por maduración de la afinidad: XAB5**

20 Se clonó el Fv XAB5 y se expresó en *E. coli* TGf1 con una marca de hexahistidina en el extremo C en la cadena pesada y una marca de estreptomycinina en el extremo C en la cadena ligera. La proteína recombinante se purificó por cromatografía con quelato de Ni seguida de cromatografía por exclusión de tamaños sobre una columna SPX-75, en tampón PBS. El análisis de CL-EM mostró la masa esperada para la cadena pesada (13703,4 Da) y la presencia de dos formas de la cadena ligera: longitud completa (115 aa; 12627,3 Da; aprox. 27 %) y con marca de estreptomycinina troncada (A1 a Q112; 12222,8 Da; aprox. 73 %).

25 Entonces se preparó el complejo de fragmento Fv XAB5 con IL-17A humana usando metodología convencional. En resumen, se mezcló IL-17A humana (1,4 mg) con un exceso de Fv XAB5 (3,4 mg) y el complejo se procesó en una cromatografía por exclusión de tamaño S100, en TRIS 10 mM pH 7,4, NaCl 25 mM. El complejo proteínico entonces se concentró por ultrafiltración a 16,5 mg/ml y se cristalizó.

30 Se siguieron protocolos convencionales de cristalización. En resumen, los cristales se hicieron crecer a 19 °C en placas de 96 pocillos de SD2, usando el método de difusión de vapor en gotas posadas. La solución madre de proteína se mezcló 1:1 con un tampón de cristalización que contenía PEG 5000 al 15 % MME, MES 0,1 M pH 6,5, sulfato de amonio 0,2 M. El tamaño de gota total fue de 0,4 µl. Antes de la recogida de datos de rayos X, se transfirió brevemente un cristal a una mezcla 1:1 del tampón de cristalización con PEG 5000 al 20 %, glicerol al 40% y después se enfrió de forma ultrarrápida en nitrógeno líquido.

35 La recogida de datos de rayos X y el procesamiento se realizaron usando protocolos convencionales. En resumen, se recogieron datos de rayos X a resolución de 3,1 Å en la Swiss Light Source, línea de luz X10SA, con un detector Pilatus, usando radiación de rayos X de 1,00000 Å. En total, se registraron 720 imágenes de 0,25° de oscilación cada una a una distancia del cristal al detector de 520 mm y se procesaron con el paquete de programa informático XDS. El cristal pertenecía al grupo espacial C222₁ con los parámetros de celda a = 55,37 Å, b = 84,08 Å, c = 156,35 Å, α = β = γ = 90°. R-sym a resolución de 3,1 Å fue de un 8,9 % y la integridad de los datos de un 99,7 %.

40 La estructura se determinó por remplazo molecular con el programa Phaser, usando modelos de búsqueda derivados del complejo de Fv XAB2 determinado previamente. Se realizó corrección iterativa de modelos y refinado con Coot (Crystallographic Object-Oriented Toolkit) y CNX (Crystallography & NMR eXplorer) versión 2002, hasta que no pudieron hacerse más mejoras significativas al modelo cristalográfico. R final y R libre para todos los datos fueron de 0,222 y 0,305, respectivamente. El modelo refinado final mostró una desviación de la media cuadrática (RMSD) de las longitudes de enlace y ángulos de enlace ideales de 0,008 Å y 1,2°, respectivamente.

Resultados

Los resultados del refinamiento de rayos X del complejo de Fv XAB5 con IL-17A humana se proporcionan en la tabla 15 y la estructura tridimensional de este complejo se muestra en la figura 6. En esta estructura cristalina, el complejo de Fv XAB5 tiene simetría doble cristalográfica exacta: la unidad asimétrica del cristal contiene únicamente una mitad del complejo dimérico total. El Fv XAB5 hace contactos con ambas subunidades de IL-17A, pero la inmensa mayoría de los contactos intermoleculares son con únicamente una subunidad (aproximadamente un 90 % de la superficie de IL-17A enterrada por el Fv XAB5 la aporta una subunidad de IL-17A). El análisis de cristalografía de rayos X confirmó que el anticuerpo variante XAB5 retenía la especificidad de diana y se unía con alta afinidad a esencialmente el mismo epítipo que el anticuerpo XAB1 precursor. Sin embargo, en la estructura del complejo de XAB5, la CDRL1 de cadena ligera alberga tres mutaciones puntuales que proporcionan unión potenciada a IL-17A humana. Trp 31 de la cadena ligera de XAB5 se acopla en fuertes interacciones hidrófobas/aromáticas con Tyr 85 de IL-17A y, en un menor grado, Phe 133 de IL-17A. Asn 30 de la cadena ligera de XAB5 dona un enlace de H al carbonilo de la cadena principal de Pro 130 de IL-17A y está en contacto de van der Waals con Leu 49 (misma subunidad de IL-17A) y Val 45 (otra subunidad de IL-17A). Glu 32 de la cadena ligera de XAB5 estabiliza el bucle de CDRL1 mediante interacciones de enlaces de H intramoleculares. Además, Glu 32 hace interacciones electrostáticas favorables con Arg 124 de IL-17A, pero no se acopla en una interacción de puente salina "cabeza a cabeza" (figura 7).

20 **Tabla 15. Refinamiento por rayos X del complejo de Fv XAB5 con IL-17A obtenido por el programa CNX.**

```

OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN 3 PROGRAMA      : CNX 2002
OBSERVACIÓN 3 AUTORES       : Brunger, Adams, Clore, Delano,
OBSERVACIÓN 3                Gros, Grosse-Kunstleve, Jiang,
OBSERVACIÓN 3                Kuszewski, Nilges, Pannu, Read,
OBSERVACIÓN 3                Rice, Simonson, Warren
OBSERVACIÓN 3                y
OBSERVACIÓN 3                Accelrys Inc.,
OBSERVACIÓN 3                (Badger, Berard, Kumar, Szalma,
OBSERVACIÓN 3                Yip, Dzakula).
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 DATOS USADOS EN EL REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN 3 INTERVALO DE RESOLUCIÓN ALTO (ANGSTROMS) : 3,11
OBSERVACIÓN 3 INTERVALO DE RESOLUCIÓN BAJO (ANGSTROMS) : 46,25
OBSERVACIÓN 3 VALOR DE CORTE DE DATOS (SIGMA(F)) : 0,0
OBSERVACIÓN 3 VALOR DE CORTE DE DATOS ALTO (ABS(F)) : 3778977,84
OBSERVACIÓN 3 VALOR DE CORTE DE DATOS BAJO (ABS(F)) : 0,000000
OBSERVACIÓN 3 EXHAUSTIVIDAD (TRABAJO+ENSAYO) (%) : 99,0
OBSERVACIÓN 3 NÚMERO DE REFLEJOS : 6801
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 AJUSTE A DATOS USADOS EN EL REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN 3 MÉTODO DE VALIDACIÓN CRUZADA : TOTALIDAD
OBSERVACIÓN 3 SELECCIÓN DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE : ALEATORIO
OBSERVACIÓN 3 VALOR R (CONJUNTO DE TRABAJO) : 0,222
OBSERVACIÓN 3 VALOR R LIBRE : 0,305
OBSERVACIÓN 3 TAMAÑO DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE (%) : 5,0
OBSERVACIÓN 3 RECUENTO DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE : 340
OBSERVACIÓN 3 ERROR ESTIMADO DE VALOR R LIBRE : 0,017
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 AJUSTE EN EL BIN DE MÁXIMA RESOLUCIÓN.
OBSERVACIÓN 3 NÚMERO TOTAL DE BINS USADOS : 6
OBSERVACIÓN 3 INTERVALO DE RESOLUCIÓN DE BIN ALTO (A) : 3,10
OBSERVACIÓN 3 INTERVALO DE RESOLUCIÓN DE BIN BAJO (A) : 3,29
OBSERVACIÓN 3 EXHAUSTIVIDAD DE BIN (TRABAJO+ENSAYO) (%) : 89,9
OBSERVACIÓN 3 REFLEJOS EN BIN (CONJUNTO DE TRABAJO) : 961
OBSERVACIÓN 3 VALOR R DE BIN (CONJUNTO DE TRABAJO) : 0,293
OBSERVACIÓN 3 VALOR R LIBRE DE BIN : 0,403
OBSERVACIÓN 3 TAMAÑO DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE DE BIN (%) : 4,9
OBSERVACIÓN 3 RECUENTO DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE DE BIN : 50
OBSERVACIÓN 3 ERROR ESTIMADO DE VALOR R LIBRE DE BIN : 0,057
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 NÚMERO DE ÁTOMOS NO HIDROGENADOS USADOS EN EL REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS DE PROTEÍNA : 2492
OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS DE ÁCIDO NUCLEICO : 0

```

ES 2 758 473 T3

```

OBSERVACIÓN 3 HETEROÁTOMOS      : 5
OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS DE DISOLVENTE      : 4
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 VALORES B.
OBSERVACIÓN 3 DE DIAGRAMA DE WILSON      (A**2) : 85,2
OBSERVACIÓN 3 VALOR B MEDIO      (GLOBAL, A**2) : 71,0
OBSERVACIÓN 3 VALOR B ANISÓTROPO GLOBAL.
OBSERVACIÓN 3 B11 (A**2) : 23,21
OBSERVACIÓN 3 B22 (A**2) : 7,23
OBSERVACIÓN 3 B33 (A**2) :-30,44
OBSERVACIÓN 3 B12 (A**2) : 0,00
OBSERVACIÓN 3 B13 (A**2) : 0,00
OBSERVACIÓN 3 B23 (A**2) : 0,00
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 MODELADO DE DISOLVENTE VOLUMINOSO.
OBSERVACIÓN 3 MÉTODO USADO : MODELO PLANO
OBSERVACIÓN 3 KSOL      : 0,389339
OBSERVACIÓN 3 BSOL      : 59,5295 (A**2)
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 ERROR DE COORDENADAS ESTIMADAS.
OBSERVACIÓN 3 ESD DE DIAGRAMA DE LUZZATI      (A) : 0,35
OBSERVACIÓN 3 ESD DE SIGMA      (A) : 0,42
OBSERVACIÓN 3 VALOR DE CORTE DE RESOLUCIÓN BAJA      (A) : 5,00
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 ERROR DE COORDENADAS ESTIMADAS DE VALIDACIÓN CRUZADA.
OBSERVACIÓN 3 ESD DE DIAGRAMA DE LUZZATI C-V      (A) : 0,51
OBSERVACIÓN 3 ESD DE SIGMA C-V      (A) : 0,45
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 DESVIACIONES DE RMS DE LOS VALORES IDEALES.
OBSERVACIÓN 3 LONGITUDES DE ENLACE      (A) : 0,008
OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS DE ENLACE      (GRADOS) : 1,2
OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS DIÉDRICOS      (GRADOS) : 23,1
OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS INDEBIDOS      (GRADOS) : 0,73
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 MODELO TÉRMICO ISOTRÓPICO : RESTRINGIDO
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 RESTRICCIONES DE FACTOR TÉRMICO ISOTRÓPICO. RMS  SIGMA
OBSERVACIÓN 3 ENLACE DE CADENA PRINCIPAL      (A**2) : 1,40 ; 1,50
OBSERVACIÓN 3 ÁNGULO DE CADENA PRINCIPAL      (A**2) : 2,49 ; 2,00
OBSERVACIÓN 3 ENLACE DE CADENA LATERAL      (A**2) : 1,82 ; 2,00
OBSERVACIÓN 3 ÁNGULO DE CADENA LATERAL      (A**2) : 2,93 ; 2,50
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 MODELO NCS : NINGUNO
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 RESTRICCIONES DE NCS.      RMS  SIGMA/PESO
OBSERVACIÓN 3 GRUPO 1 POSICIONAL      (A) : NULO ; NULO
OBSERVACIÓN 3 GRUPO 1 FACTOR B      (A**2) : NULO ; NULO
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE PARÁMETROS 1 : protein_rep.param
OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE PARÁMETROS 2 : water_rep.param
OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE PARÁMETROS 3 : ion.param
OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE TOPOLOGÍA 1 : protein_no_cter.top
OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE TOPOLOGÍA 2 : water.top
OBSERVACIÓN 3 ARCHIVO DE TOPOLOGÍA 4 : ion.top
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 OTRAS OBSERVACIONES DE REFINAMIENTO: NULO
ENLACE DISULFURO 1 CYS S 23 CYS S 88
ENLACE DISULFURO 2 CYS S 22 CYS S 96
ENLACE DISULFURO 3 CYS S 94 CYS S 144
ENLACE DISULFURO 4 CYS S 99 CYS S 146
CRIST1 55,372 84,082 156,350 90,00 90,00 90,00 C 2 2 21 24
ORIGX1 1,000000 0,000000 0,000000 0,000000
ORIGX2 0,000000 1,000000 0,000000 0,000000
ORIGX3 0,000000 0,000000 1,000000 0,000000
ESCALA1 0,018060 0,000000 0,000000 0,000000

```

ESCALA2	0,000000	0,011893	0,000000	0,000000
ESCALA3	0,000000	0,000000	0,006396	0,000000

La figura 6 proporciona la estructura tridimensional del complejo de Fv XAB5 con IL-17A humana. El complejo homodimérico completo con simetría doble cristalográfica exacta se muestra aquí. La figura 6A muestra los dos fragmentos Fv XAB5 en representación de relleno de espacios y el homodímero de IL-17A se muestra en representación de dibujos. La figura 6B muestra los dos fragmentos Fv XAB5 en representación de dibujos y el homodímero de IL-17A se muestra en representación de relleno de espacios. La cadena pesada y ligera del Fv XAB5 se muestran en negro y gris claro, respectivamente. Una cadena del homodímero de IL-17A se muestra en gris claro, la otra se muestra en gris oscuro.

La figura 7 proporciona la estructura tridimensional del complejo de Fv XAB5 con IL-17A humana. Vista en primer plano de la L-CDR1 del anticuerpo que alberga las tres mutaciones encontradas por estrategia de colección sesgada guiada por la estructura: Asn 30, Trp 31 y Glu 32. Estas cadenas laterales de XAB5 aportan nuevas interacciones de unión a la IL-17A humana antigénica, en particular a los restos de IL-17A Tyr85, Phe133, Arg124, Pro 130, Leu 49 (todos de la misma subunidad de IL-17A) y Val 45 (de la otra subunidad de IL-17A).

Ejemplo 7. Análisis de rayos X de variantes de anticuerpo derivadas por maduración de la afinidad: XAB4

Se clonó el Fv XAB4 y se expresó en células de *E. coli* TG1 con una marca de hexahistidina en el extremo C en la cadena pesada y una marca de estreptomina en el extremo C en la cadena ligera. La proteína recombinante se purificó por cromatografía con quelato de Ni.

Entonces se preparó el complejo de fragmento Fv XAB4 con IL-17A humana usando metodología convencional. En resumen, se mezcló IL-17A humana (0,5 mg) con un exceso de Fv XAB4 (1,2 mg) y el complejo se procesó en una cromatografía por exclusión de tamaño SPX-75, en TRIS 10 mM pH 7,4, NaCl 25 mM. El complejo proteínico entonces se concentró por ultrafiltración a 6,9 mg/ml y se cristalizó.

Se siguieron protocolos convencionales de cristalización. En resumen, los cristales se hicieron crecer a 19 °C en placas de 24 pocillos de VDX, usando el método de difusión de vapor en gotas colgantes. La solución madre de proteína se mezcló 2:1 con un tampón de cristalización que contenía PEG 5000 al 15 % MME, MES 0,1 M pH 6,5, sulfato de amonio 0,2 M. El tamaño de gota total fue de 3,0 µl. Antes de la recogida de datos de rayos X, se transfirió brevemente un cristal a una mezcla 1:1 del tampón de cristalización con PEG 5000 al 25 %, MME glicerol al 20 % y después se enfrió de forma ultrarrápida en nitrógeno líquido.

La recogida de datos de rayos X y el procesamiento se realizaron usando protocolos convencionales. En resumen, se recogieron datos de rayos X a resolución de 3,15 Å en la Swiss Light Source, línea de luz X10SA, con un detector Pilatus, usando radiación de rayos X de 0,99984 Å. En total, se registraron 720 imágenes de 0,25° de oscilación cada una a una distancia del cristal al detector de 500 mm y se procesaron con el paquete de programa informático XDS. El cristal pertenecía al grupo espacial C222₁ con los parámetros de celda a = 55,76 Å, b = 87,11 Å, c = 156,31 Å, α = β = γ = 90°. R-sym a resolución de 3,15 Å fue de un 5,5 % y la integridad de los datos de un 99,9 %.

Como el cristal del complejo de Fv XAB4 era casi isomorfo con el cristal del complejo de Fv XAB5 (ejemplo 6), la estructura del último se usó como modelo de entrada para la determinación de la estructura por remplazo molecular con el programa Phaser. Se realizó corrección iterativa de modelos y refinado con Coot (Crystallographic Object-Oriented Toolkit) y Autobuster versión 1.11.2 (Buster versión 2.11.2), hasta que no pudieron hacerse más mejoras significativas al modelo cristalográfico. R total y R libre para todos los datos fueron de 0,197 y 0,253, respectivamente. El modelo refinado final mostró una desviación de la media cuadrática (RMSD) de las longitudes de enlace y ángulos de enlace ideales de 0,009 Å y 1,0°, respectivamente.

(i) Resultados

Los resultados del refinamiento de rayos X del complejo de Fv XAB4 con IL-17A humana se proporcionan en la tabla 16 y la estructura tridimensional de este complejo se muestra en la figura 8. En esta estructura cristalina, como en el complejo de XAB5 (ejemplo 6), el complejo de Fv XAB4 tiene simetría doble cristalográfica exacta: la unidad asimétrica del cristal contiene únicamente una mitad del complejo dimérico total. El Fv XAB4 hace contactos con ambas subunidades de IL-17A, pero la inmensa mayoría de los contactos intermoleculares son con únicamente una subunidad (un 93 % de la superficie de IL-17A enterrada por un Fv XAB4 la aporta una subunidad). El análisis de cristalografía de rayos X confirmó que el anticuerpo variante XAB4 retenía la especificidad de diana y se unía con alta afinidad a esencialmente el mismo epítipo que el anticuerpo XAB1 precursor. Sin embargo, en la estructura del complejo de XAB4, como en la estructura del complejo de XAB5, la CDRL1 de cadena ligera alberga tres mutaciones puntuales que proporcionan unión potenciada a IL-17A humana. Como ya se ha descrito para el complejo de XAB5 (ejemplo 6), Trp 31 de la cadena ligera de XAB4 se acopla en fuertes interacciones hidrófobas/aromáticas con Tyr 85 de IL-17A y, en un menor grado, Phe 133 de IL-17A. Asn 30 de la cadena ligera de XAB4 dona un enlace de H al carbonilo de la cadena principal de Pro 130 de IL-17A y está en contacto de van der Waals con Leu 49 (misma

subunidad de IL-17A) y Val 45 (otra subunidad de IL-17A). Glu 32 de la cadena ligera de XAB4 estabiliza el bucle de CDRL1 mediante interacciones de enlaces de H intramoleculares. Además, Glu 32 hace interacciones electrostáticas favorables con Arg 124 de IL-17A, pero no se acopla en una interacción de puente salina "cabeza a cabeza" (figura 9). XAB4 también difiere de XAB1 en la posición 56 de la cadena ligera, como resultado de una mutación de Asn a Gln diseñada para eliminar el posible sitio de desamidación. El análisis de rayos X muestra que Gln 56 de XAB4 hace contactos con los restos del antígeno proteínico Leu 76 y Trp 90, y reduce la accesibilidad al disolvente de Tyr 67 y Ser 64 (figura 10).

Tabla 16. Refinamiento por rayos X del complejo de Fv XAB4 con IL-17A obtenido por el programa Autobuster.

OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN 3 PROGRAMA : BUSTER 2.11.2
OBSERVACIÓN 3 AUTORES : BRICOGNE,BLANC,BRANDL,FLENSBURG,KELLER,
OBSERVACIÓN 3 : PACIOREK,ROVERSI,SHARFF,SMART,VONRHEIN,WOMACK;
OBSERVACIÓN 3 : MATTHEWS,TEN EYCK,TRONRUD
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 DATOS USADOS EN EL REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN 3 INTERVALO DE RESOLUCIÓN ALTO (ANGSTROMS) : 3,15
OBSERVACIÓN 3 INTERVALO DE RESOLUCIÓN BAJO (ANGSTROMS) : 78,15
OBSERVACIÓN 3 VALOR DE CORTE DE DATOS (SIGMA(F)) : 0,0
OBSERVACIÓN 3 EXHAUSTIVIDAD PARA INTERVALO (%) : 99,85
OBSERVACIÓN 3 NÚMERO DE REFLEJOS : 6881
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 AJUSTE A DATOS USADOS EN EL REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN 3 MÉTODO DE VALIDACIÓN CRUZADA : TOTALIDAD
OBSERVACIÓN 3 SELECCIÓN DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE : ALEATORIO
OBSERVACIÓN 3 VALOR R (CONJUNTO DE TRABAJO + ENSAYO) : 0,1998
OBSERVACIÓN 3 VALOR R (CONJUNTO DE TRABAJO) : 0,1972
OBSERVACIÓN 3 VALOR R LIBRE : 0,2531
OBSERVACIÓN 3 TAMAÑO DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE (%) : 5,01
OBSERVACIÓN 3 RECUENTO DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE : 345
OBSERVACIÓN 3 ERROR ESTIMADO DE VALOR R LIBRE : NULO
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 AJUSTE EN EL BIN DE MÁXIMA RESOLUCIÓN.
OBSERVACIÓN 3 NÚMERO TOTAL DE BINS USADOS : 5
OBSERVACIÓN 3 INTERVALO DE RESOLUCIÓN DE BIN ALTO (ANGSTROMS) : 3,15
OBSERVACIÓN 3 INTERVALO DE RESOLUCIÓN DE BIN BAJO (ANGSTROMS) : 3,52
OBSERVACIÓN 3 EXHAUSTIVIDAD DE BIN (TRABAJO+ENSAYO) (%) : 99,85
OBSERVACIÓN 3 REFLEJOS EN BIN (CONJUNTO DE TRABAJO + ENSAYO) : 1916
OBSERVACIÓN 3 VALOR R DE BIN (CONJUNTO DE TRABAJO + ENSAYO) : 0,2376
OBSERVACIÓN 3 REFLEJOS EN BIN (CONJUNTO DE TRABAJO) : 1820
OBSERVACIÓN 3 VALOR R DE BIN (CONJUNTO DE TRABAJO) : 0,2326
OBSERVACIÓN 3 VALOR R LIBRE DE BIN : 0,3295
OBSERVACIÓN 3 TAMAÑO DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE DE BIN (%) : 5,01
OBSERVACIÓN 3 RECUENTO DE CONJUNTO DE ENSAYOS DE VALOR R LIBRE DE BIN : 96
OBSERVACIÓN 3 ERROR ESTIMADO DE VALOR R LIBRE DE BIN : NULO
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 NÚMERO DE ÁTOMOS NO HIDROGENADOS USADOS EN EL REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS DE PROTEÍNA : 2499
OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS DE ÁCIDO NUCLEICO : 0
OBSERVACIÓN 3 HETEROÁTOMOS : 5
OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS DE DISOLVENTE : 0
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 VALORES B.
OBSERVACIÓN 3 DE DIAGRAMA DE WILSON (A**2) : 102,42
OBSERVACIÓN 3 VALOR B MEDIO (GLOBAL, A**2) : 124,95
OBSERVACIÓN 3 VALOR B ANISÓTROPO GLOBAL.
OBSERVACIÓN 3 B11 (A**2) : -11,5511
OBSERVACIÓN 3 B22 (A**2) : -28,0012
OBSERVACIÓN 3 B33 (A**2) : 39,5523
OBSERVACIÓN 3 B12 (A**2) : 0,0000
OBSERVACIÓN 3 B13 (A**2) : 0,0000
OBSERVACIÓN 3 B23 (A**2) : 0,0000
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 ERROR DE COORDENADAS ESTIMADAS.

ES 2 758 473 T3

OBSERVACIÓN 3 ESD DE DIAGRAMA DE LUZZATI (A) : 0,787
 OBSERVACIÓN 3 DPI (EC-9 DE BLOW) BASADO EN VALOR R LIBRE (A) : 0,474
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 REFERENCIAS: BLOW, D. (2002) ACTA CRYST D58, 792-797
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 COEFICIENTES DE CORRELACIÓN.
 OBSERVACIÓN 3 COEFICIENTE DE CORRELACIÓN FO-FC : 0,9113
 OBSERVACIÓN 3 COEFICIENTE DE CORRELACIÓN FO-FC LIBRE : 0,8848
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 PESO EN RAYOS X : 20,89
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 FUNCIÓN DE GEOMETRÍA.
 OBSERVACIÓN 3 COLECCIONES DE RESTRICCIÓN.
 OBSERVACIÓN 3 NÚMERO DE COLECCIONES USADAS : 8
 OBSERVACIÓN 3 COLECCIÓN 1 : protgeo_eh99.dat (V1.8) 20110121 CONVENCIONAL
 OBSERVACIÓN 3 DICCIONARIO DE AMINOÁCIDOS. ENLACES Y ÁNGULOS DE
 OBSERVACIÓN 3 ENGH Y HUBER EH99. OTROS VALORES BASADOS EN
 OBSERVACIÓN 3 TNT PREVIO O TOMADOS DE CCP4. INCLUYE
 OBSERVACIÓN 3 ÁTOMOS DE HIDRÓGENO.
 OBSERVACIÓN 3 COLECCIÓN 2 : exoticaa.dat (V1.8) 20100430 COLECCIÓN DE
 OBSERVACIÓN 3 AMINOÁCIDOS NO CONVENCIONALES, PRINCIPALMENTE EH91 SIN
 OBSERVACIÓN 3 INFO DE DISTANCIA IDEAL
 OBSERVACIÓN 3 COLECCIÓN 3 : nuclgeo.dat (V1.14) 20091104
 OBSERVACIÓN 3 COLECCIÓN 4 : bcorrel.dat (V1.15) 20080423
 OBSERVACIÓN 3 COLECCIÓN 5 : contact.dat (V1.20.2.1) 20110510
 OBSERVACIÓN 3 COLECCIÓN 6 : idealdist_contact.dat (V1.7) 20110119
 OBSERVACIÓN 3 DATOS DE TÉRMINO DE CONTACTO EN DISTANCIA IDEAL COMO SE USA
 EN
 OBSERVACIÓN 3 PROLSQ. LOS VALORES USADOS AQUÍ SE BASAN EN LA
 OBSERVACIÓN 3 IMPLEMENTACIÓN REFMAC 5.5.
 OBSERVACIÓN 3 COLECCIÓN 7 : restricciones para SO4 (ION SULFATO) de
 OBSERVACIÓN 3 diccionario cif SO4.cif usando revisión de refmacdict2tnt
 OBSERVACIÓN 3 1.23.2.7; buster common-compounds v 1.0 (5 de mayo
 OBSERVACIÓN 3 de 2011)
 OBSERVACIÓN 3 COLECCIÓN 8 : assume.dat (V1.10) 20110113
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 NÚMERO DE TÉRMINOS DE FUNCIÓN GEOMÉTRICA DEFINIDOS: 15
 OBSERVACIÓN 3 TÉRMINO RECUENTO PESO FUNCIÓN.
 OBSERVACIÓN 3 LONGITUDES DE ENLACE : 2566 ; 2,00 ; ARMÓNICO
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS DE ENLACE : 3486 ; 2,00 ; ARMÓNICO
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS DE TORSIÓN : 860 ; 2,00 ; SINUSOIDE
 OBSERVACIÓN 3 PLANOS DE CARBONO TRIGONALES : 61 ; 2,00 ; ARMÓNICO
 OBSERVACIÓN 3 PLANOS GENERALES : 369 ; 5,00 ; ARMÓNICO
 OBSERVACIÓN 3 FACTORES TÉRMINOS ISOTRÓPICOS : 2566 ; 20,00 ; ARMÓNICO
 OBSERVACIÓN 3 MALOS CONTACTOS SIN ENLACE : NULO ; NULO ; NULO
 OBSERVACIÓN 3 TORSIONES INDEBIDAS : NULO ; NULO ; NULO
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS DE SEUDORROTACIÓN : NULO ; NULO ; NULO
 OBSERVACIÓN 3 TORSIÓN QUIRAL INDEBIDA : 323 ; 5,00 ; SEMIARMÓNICO
 OBSERVACIÓN 3 SUMA DE OCUPACIONES : NULO ; NULO ; NULO
 OBSERVACIÓN 3 DISTANCIAS DE UTILIDAD : NULO ; NULO ; NULO
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS DE UTILIDAD : NULO ; NULO ; NULO
 OBSERVACIÓN 3 TORSIÓN DE UTILIDAD : NULO ; NULO ; NULO
 OBSERVACIÓN 3 TÉRMINO DE CONTACTO EN DIST. IDEAL : 2984 ; 4,00 ; SEMIARMÓNICO
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 DESVIACIONES DE RMS DE LOS VALORES IDEALES.
 OBSERVACIÓN 3 LONGITUDES DE ENLACE (A) : 0,009
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS DE ENLACE (GRADOS) : 1,00
 OBSERVACIÓN 3 ÁNGULOS DE TORSIÓN OMEGA DEL PÉPTIDO (GRADOS) : 4,39
 OBSERVACIÓN 3 OTROS ÁNGULOS DE TORSIÓN (GRADOS) : 18,96
 OBSERVACIÓN 3
 OBSERVACIÓN 3 SIMILITUD.
 OBSERVACIÓN 3 NCS.
 OBSERVACIÓN 3 REPRESENTACIÓN DE NCS : NINGUNO
 OBSERVACIÓN 3 RESTRICCIONES DE DIANA.
 OBSERVACIÓN 3 REPRESENTACIÓN DE DIANA : LSSR

ES 2 758 473 T3

```

OBSERVACIÓN 3 ESTRUCTURA DE DIANA : xab5_il17a_complex_final_buster.pdb
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 DETALLES DE TLS.
OBSERVACIÓN 3 NÚMERO DE GRUPOS TLS :      3
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 GRUPOS TLS :      1
OBSERVACIÓN 3 CONJUNTO : { H|* }
OBSERVACIÓN 3 ORIGEN DEL GRUPO (A): 10,9676 -8,7396 -10,1379
OBSERVACIÓN 3 TENSOR T
OBSERVACIÓN 3 T11: -0,1266 T22: 0,0257
OBSERVACIÓN 3 T33: -0,2829 T12: -0,3040
OBSERVACIÓN 3 T13: -0,0312 T23: 0,1050
OBSERVACIÓN 3 TENSOR L
OBSERVACIÓN 3 L11: 7,4496 L22: 4,4770
OBSERVACIÓN 3 L33: 4,2880 L12: 1,1123
OBSERVACIÓN 3 L13: -1,8044 L23: 3,0307
OBSERVACIÓN 3 TENSOR S
OBSERVACIÓN 3 S11: 0,2013 S12: 0,3070 S13: -0,5774
OBSERVACIÓN 3 S21: 0,4752 S22: -0,5377 S23: 0,7096
OBSERVACIÓN 3 S31: 1,0885 S32: -1,0885 S33: 0,3364
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 GRUPOS TLS :      2
OBSERVACIÓN 3 CONJUNTO : { I|* }
OBSERVACIÓN 3 ORIGEN DEL GRUPO (A): 22,7365 0,7101 -35,1243
OBSERVACIÓN 3 TENSOR T
OBSERVACIÓN 3 T11: -0,1883 T22: 0,1529
OBSERVACIÓN 3 T33: -0,3560 T12: 0,0318
OBSERVACIÓN 3 T13: -0,1985 T23: 0,0144
OBSERVACIÓN 3 TENSOR L
OBSERVACIÓN 3 L11: 2,7494 L22: 9,3427
OBSERVACIÓN 3 L33: 3,8648 L12: 0,8073
OBSERVACIÓN 3 L13: -0,6650 L23: -2,0544
OBSERVACIÓN 3 TENSOR S
OBSERVACIÓN 3 S11: 0,0485 S12: 0,3188 S13: 0,0579
OBSERVACIÓN 3 S21: 0,0595 S22: 0,1433 S23: 0,7000
OBSERVACIÓN 3 S31: 0,0050 S32: -0,6066 S33: -0,1917
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 GRUPOS TLS :      3
OBSERVACIÓN 3 CONJUNTO : { L|* }
OBSERVACIÓN 3 ORIGEN DEL GRUPO (A): 33,2517 -11,1794 -14,2151
OBSERVACIÓN 3 TENSOR T
OBSERVACIÓN 3 T11: 0,0667 T22: -0,1645
OBSERVACIÓN 3 T33: -0,2360 T12: 0,1870
OBSERVACIÓN 3 T13: -0,2270 T23: -0,1209
OBSERVACIÓN 3 TENSOR L
OBSERVACIÓN 3 L11: 3,3694 L22: 3,7848
OBSERVACIÓN 3 L33: 8,8916 L12: -0,6497
OBSERVACIÓN 3 L13: -2,6132 L23: 0,8234
OBSERVACIÓN 3 TENSOR S
OBSERVACIÓN 3 S11: -0,0839 S12: -0,2629 S13: -0,1560
OBSERVACIÓN 3 S21: 0,3804 S22: 0,7574 S23: -0,5378
OBSERVACIÓN 3 S31: 1,0885 S32: 1,0885 S33: -0,6736
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 NOTAS DE REFINAMIENTO.
OBSERVACIÓN 3 NÚMERO DE NOTAS DE REFINAMIENTO : 1
OBSERVACIÓN 3 NOTA 1 : CONFIGURACIÓN DE CONTACTO DEL TÉRMINO DE CONTACTO A DIST.
IDEAL. TODOS LOS ÁTOMOS
OBSERVACIÓN 3 TIENEN TIPO DE ÁTOMO CCP4 DE LA COLECCIÓN
OBSERVACIÓN 3
OBSERVACIÓN 3 OTRAS OBSERVACIONES DE REFINAMIENTO: NULO
OBSERVACIÓN 3
ENLACE DISULFURO 1 CYS H 22 CYS H 96 1555 1555 2,03
ENLACE DISULFURO 2 CYS I 94 CYS I 144 1555 1555 2,05
ENLACE DISULFURO 3 CYS I 99 CYS I 146 1555 1555 2,04
ENLACE DISULFURO 4 CYS L 23 CYS L 88 1555 1555 2,07

```

CISPEP 1 TYR I 85 PRO I 86 0 3,67
 CISPEP 2 GLU I 125 PRO I 126 0 -9,25
 CISPEP 3 PRO I 126 PRO I 127 0 5,92
 CISPEP 4 SER L 7 PRO L 8 0 -6,50
 CISPEP 5 TYR L 94 PRO L 95 0 -6,52
 CRIST1 55,760 87,109 156,306 90,00 90,00 90,00 C 2 2 21

- 5 La figura 8 proporciona la estructura tridimensional del complejo de Fv XAB4 con IL-17A humana. La figura 8A muestra los dos fragmentos Fv XAB4 en representación de relleno de espacios y el homodímero de IL-17A se muestra en representación de dibujos. La figura 8B muestra los dos fragmentos Fv XAB4 en representación de dibujos y el homodímero de IL-17A se muestra en representación de relleno de espacios. La cadena pesada y ligera del Fv XAB4 se muestran en negro y gris claro, respectivamente. Una cadena del homodímero de IL-17A se muestra en gris claro, la otra se muestra en gris oscuro.
- 10 La figura 9 proporciona la estructura tridimensional del complejo de Fv XAB4 con IL-17A humana como una vista en primer plano de la L-CDR1 del anticuerpo que alberga las tres mutaciones encontradas por estrategia de colección sesgada guiada por la estructura: Asn 30, Trp 31 y Glu 32. Estas cadenas laterales de XAB4 aportan nuevas interacciones de unión a la IL-17A humana antigénica, en particular a los restos de IL-17A Tyr85, Phe133, Arg124, Pro 130, Leu 49 (todos de la misma subunidad de IL-17A) y Val 45 (de la otra subunidad de IL-17A).
- 15 La figura 10 proporciona la estructura tridimensional del complejo de Fv XAB4 con IL-17A humana como una vista en primer plano de la L-CDR2 del anticuerpo que muestra la mutación de Asn 56 a Gln. Esta cadena lateral de XAB4 aporta contactos de unión a los restos de IL-17A Trp 90 y Leu 76, y reduce la accesibilidad al disolvente de Tyr 67 y Ser 64 (todos de la misma subunidad de IL-17A).
- 20 Resumiendo, el análisis de cristalografía de rayos X confirmó que los anticuerpos variantes seleccionados para análisis adicional retenían su especificidad de diana y se unían con alta afinidad a esencialmente el mismo epítipo que el anticuerpo XAB1 precursor. Se observó una unión más compacta entre cada uno de los anticuerpos variantes e IL-17A, como el resultado de contactos de unión adicionales o mejorados (véase la tabla 17 a continuación).
- 25 Se realizó caracterización adicional de los anticuerpos variantes como se describe a continuación.

Tabla 17. Análisis de rayos X del epítipo IL-17A unido por XAB1, XAB2, XAB4 y XAB5: resumen y clasificación cualitativa basada en la estructura de los restos del epítipo. (*): resto aportado por la segunda subunidad de IL-17A.

Clase de resto del epítipo	XAB1	XAB2	XAB4	XAB5
Restos muy importantes del epítipo	Arg 78, Glu 80, Trp 90	Arg 78, Glu 80, Trp 90	Arg 78, Glu 80, Tyr 85, Trp 90, Arg 124	Arg 78, Glu 80, Tyr 85, Trp 90, Arg 124
Otros restos importantes del epítipo	Pro 82, Ser 87, Val 88, Arg 124	Arg 43*, Pro 82, Ser 87, Val 88, Arg 124	Pro 82, Ser 87, Val 88	Pro 82, Ser 87, Val 88
Contribuciones adicionales	Val 45*, Leu 49, Ile 51, Asp 81, Glu 83, Tyr 85, Asn 131, Lys 137*	Pro 42*, Val 45*, Leu 49, Ile 51, Asp 81, Glu 83, Tyr 85, Asn 131, Lys 137*	Val 45*, Leu 49, Asp 81, Glu 83, Pro 86, Pro 130, Phe 133, Lys 137*	Val 45*, Leu 49, Asp 81, Glu 83, Pro 86, Pro 130, Phe 133, Lys 137*
Poca o ninguna contribución directa	Thr 44*, Leu 76, His 77, Asn 79, Arg 84, Pro 86, Lys 93, Glu 118*, Pro 130, Phe 133	Leu 76, His 77, Asn 79, Arg 84, Pro 86, Lys 93, Glu 118*, Pro 130, Phe 133	Arg 43*, Asn 50, Ser 64, Tyr 67, Leu 76, His 77, Asn 79, Arg 84, Glu 118*, Leu 122, Asn 131, Leu 135*	Arg 43*, Asn 50, Leu 76, His 77, Asn 79, Arg 84, Glu 118*, Leu 122, Asn 131, Leu 135*

30

Ejemplo 8. Mediciones de afinidad y reactividad cruzada medida por Biacore™

35 La determinación de los parámetros cinéticos de unión se consiguió por mediciones de resonancia de plasmones superficiales usando el biosensor óptico Biacore™ T200 o T100 (<http://www.biacore.com>). Esta tecnología permite la determinación sin marcadores de las constantes de velocidad microscópicas para la unión (k_a) y la disociación (k_d) de un ligando a un receptor. Por lo tanto, es especialmente adecuada para caracterizar las interacciones de anticuerpo-antígeno.

40 La unión indirecta de los anticuerpos a la superficie del chip Biacore™ se hizo mediante un anticuerpo anti-Ig humana (GE Healthcare Bio-Sciences AB; Cat. n.º BR-1008-39) a 25 µg/ml en tampón de inmovilización (acetato de sodio

10 mM pH 5,0) o mediante proteína A (RepliGen: rPA-50) a 20 µg/ml en tampón de inmovilización (acetato de sodio 10 mM pH 5,0 o pH 4,0).

El anticuerpo se diluyó en tampón de blanco hasta una concentración final de 1,00 o 1,25 µg/ml.

5 Las mediciones de afinidad para la determinación de las constantes de disociación de XAB4 o XAB1 se realizaron para huL-17A recombinante (SEQ ID NO: 78; por ejemplo concentración crecientes duplicadas de 0,14 a 8,8 nM), heterodímero de huL-17A/F recombinante (por ejemplo, concentraciones crecientes duplicadas de 0,13 a 8 nM), huL-17F recombinante (SEQ ID NO: 77; por ejemplo, concentraciones crecientes duplicadas de 7,8 a 500 nM), IL-17A de macaco cangrejero (SEQ ID NO: 79; por ejemplo, concentraciones crecientes duplicadas de 0,63 a 40 nM), IL-17A de macaco de la India (SEQ ID NO: 82; por ejemplo, concentraciones crecientes duplicadas de 1,6 a 100 nM), IL-17A de tití (SEQ ID NO: 82; por ejemplo, concentraciones crecientes duplicadas de 0,63 a 40 nM), mL-17A recombinante (SEQ ID NO: 83; por ejemplo, concentraciones crecientes duplicadas de 0,78 a 50 nM), mL-17A/F recombinante (R&D Systems® Cat n.º 5390-IL; por ejemplo, concentraciones crecientes duplicadas de 1,25 a 40 nM), IL-17A de rata (SEQ ID NO: 85; por ejemplo, concentraciones crecientes duplicadas de 0,78 a 50 nM), usando el método indirecto de acoplamiento/unión (véase anteriormente) y la superficie se regeneró con glicina 10 mM pH 1,75 o MgCl₂ (3 M). Una superficie de chip se recubrió y reutilizó sin pérdida importante de capacidad de unión. Las concentraciones de ligando se eligieron para empezar por debajo de la K_D y para acabar a una concentración mayor de diez veces la K_D.

20 Se usaron condiciones similares, pero no idénticas, para medir la afinidad de XAB2 y XAB3.

Las señales cinéticas se evaluaron con el programa informático Biacore™ T200 Control versión 1.0. El conjunto completo de estas señales con concentraciones crecientes se toma en conjunto y se llama desarrollo. Se incluyeron dos muestras de concentración cero (desarrollos del blanco) se incluyeron en cada serie de concentración de analito para permitir una referencia doble durante la evaluación de los datos.

Resultados

30 La unión de los anticuerpos anti-IL-17 XAB4, XAB1, XAB2 y XAB3 a IL-17A humana, de macaco cangrejero, de tití, macaco de la India, de ratón y rata, a heterodímero de IL-17A/F humana y de ratón y a IL-17F humana se determinó por resonancia de plasmones superficiales usando la tecnología Biacore™.

Se calcularon las constantes de velocidad cinéticas para la asociación (k_a) y la disociación (k_d), así como la constante de disociación en equilibrio (K_D).

35 Los datos de afinidad de XAB4 se muestran en la tabla 18, los datos de afinidad de XAB1 se muestran en la tabla 19, los datos de afinidad de XAB2 se muestran en la tabla 20, y los datos de afinidad de XAB3 se muestran en la tabla 21. La maduración de la afinidad de XAB1, XAB2 y XAB3 aumentó la afinidad hacia IL-17A humana, de macaco cangrejero, ratón y rata.

40 **Tabla 18. Afinidad y constantes de velocidad cinéticas de la unión de XAB4.**

Antígeno	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
huL-17A	4,1 ± 0,1 E+06	2,3 ± 0,1 E-05	5,7 ± 0,0 E-12
huL-17A/F	8,9 ± 0,2 E+5	< 1,0 ± 0,0 E-05*	< 1,1 ± 0,0 E-11*
huL-17F	n.d.	n.d.	n.d.
maclL-17A	4,1 ± 0,5 E+05	1,3 ± 0,0 E-05	3,1 ± 0,4 E-11
IL-17A de tití	1,2 ± 0,0 E+06	2,2 ± 0,0 E-05	1,8 ± 0,0 E-11
rhesIL-17A	3,0 ± 0,1 E+05	1,2 ± 0,1 E-05	4,0 ± 0,1 E-11
mIL-17A	3,8 ± 0,1 E+05	6,2 ± 0,3 E-05	1,6 ± 0,1 E-10
mIL-17A/F	2,421E+05	6,305E-05	2,604 E-10

IL-17A de rata	5,5 ± 0,4 E+05	4,6 ± 0,9 E-05	8,4 ± 1,0 E-11
----------------	----------------	----------------	----------------

n.d. = no determinable, intervalo de conc. de antígeno aplicado demasiado bajo y unión no específica de antígeno a la cubeta de lectura de referencia observada a las concentraciones de antígeno más altas (500-50 pM).
 *velocidad de disociación fuera de los límites que pueden medirse por el instrumento ($k_d < 1 \times 10^{-5}$ 1/s)

5 **Tabla 19. Afinidad y constantes de velocidad cinéticas de la unión de XAB1.**

Antígeno	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
huIL-17A	2,33E+06	9,39E-05	4,03E-11
huIL-17A/F	9,097E+05	0,001342	1,475E-09
huIL-17F	n.d.	n.d.	n.d.
maclIL-17A	2,14E+05	1,13E-04	5,26E-10
rhesIL-17A	8,87E+05	9,97E-05	1,12E-09
mIL-17A	4,05E+05	1,43E-04	3,53E-10
mIL-17A/F	1,8757E+05	9,547E-04	5,093E-09
IL-17A de rata	5,44E+05	1,64E-04	3,01E-10

n.d. = no determinable, intervalo de conc. de antígeno aplicado demasiado bajo y unión no específica de antígeno a la cubeta de lectura de referencia observada a las tres concentraciones de antígeno más altas (500-50 pM).

Tabla 20. Afinidad y constantes de velocidad cinéticas de la unión de XAB2.

Antígeno	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
huIL-17A	4,09E+06	7,12E-05	1,76E-11

10

Tabla 21. Afinidad y constantes de velocidad cinéticas de la unión de XAB3.

Antígeno	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
huIL-17A	5,48E+06	5,01E-05	9,58E-12
huIL-17A/F	3,37E+06	1,03E-04	3,29E-11
huIL-17F	n.d.	n.d.	n.d.
maclIL-17A	1,21E+06	4,23E-05	3,49E-11
mIL-17A	5,87E+05	1,01E-04	1,74E-10
IL-17A de rata	9,05E+05	7,59E-05	8,26E-11

n.d. = no determinable

15 Las afinidades y constantes de velocidad cinéticas para XAB2, XAB3 y XAB5 son comparables a las observadas para XAB4.

Ejemplo 9. Unión en ELISA a IL-17A y otros miembros de la familia

Se realizó una valoración de los anticuerpos de interés sobre diferentes antígenos. En resumen, los pocillos de placas de microvaloración de ELISA (placas Nunc Immuno MaxiSorp: Invitrogen, Cat n.º 4-39454A) se recubrieron con 1 µg/ml de huIL-17A recombinante (SEQ ID NO: 76; 1,8 mg/ml), huIL-17A/F recombinante (0,59 mg/ml), huIL-17F recombinante (SEQ ID NO: 77; 1,8 mg/ml), huIL-17B recombinante (R&D Systems® Cat n.º 1248IB/CF), huIL-17C recombinante (R&D Systems® Cat n.º 1234IL/CF), huIL-17D recombinante (R&D Systems® Cat n.º 1504IL/CF), huIL-17E recombinante (R&D Systems® Cat n.º 1258-IL/CF), maIL-17A recombinante (SEQ ID NO: 79; 0,21 mg/ml), maIL-17F recombinante (SEQ ID NO: 80; 1,525 mg/ml), mL-17A recombinante (SEQ ID NO: 83; 2,8 mg/ml), mL-17A/F recombinante (R&D Systems® Cat n.º 5390-IL), mL-17F recombinante (SEQ ID NO: 84; 0,2 mg/ml) y IL-17A de rata recombinante (SEQ ID NO: 85; 3,8 mg/ml) (100 µl/pocillo) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin Ca y Mg (10x; Invitrogen Cat n.º 14200-083) NaN₃ al 0,02 % (Sigma Cat n.º S-8032) y se incubaron durante una noche a 4 °C.

El siguiente día, las placas de microvaloración se bloquearon con 300 µl de PBS/BSA al 2 % (fracción V; Roche Cat n.º 10 735 094 001)/NaN₃ al 0,02 % durante 1 h a 37 °C. Las placas entonces se lavaron 4 veces con PBS/Tween 20 al 0,05 % (Sigma Cat n.º P7949)/NaN₃ al 0,02 %. Se añadió XAB4 o XAB1 a 1 µg/ml en pocillos triplicados (100 µl/pocillo) durante 3 h a temperatura ambiente.

Para verificar el recubrimiento de antígenos en las placas, se usaron anticuerpos de control y, en particular, un mAb de ratón anti-huIL-17F (Novartis, 5 µg/ml) un anticuerpo de cabra anti-hu-IL-17B (R&D Systems® Cat n.º AF1248; 10 µg/ml), un mAb de ratón anti-huIL-17C (R&D Systems® Cat n.º MAB1234; 10 µg/ml), un anticuerpo de cabra anti-huIL-17D (R&D Systems® Cat n.º AF1504; 10 µg/ml), un mAb de ratón anti-hu-IL-17E (R&D Systems® Cat n.º MAB1258; 10 µg/ml), un anticuerpo de ratón anti-mL-17A o anti-mL-17A/F (Novartis; 1 µg/ml) y un anticuerpo de rata anti-mL-17F (R&D Systems® Cat n.º MAB2057; 1 µg/ml); (100 µl/pocillo en PBS, NaN₃ al 0,02 % durante 3 h a TA).

Las placas entonces se lavaron 4 veces con PBS/Tween 20 al 0,05 %/NaN₃ al 0,02 %. Después, se añadió un anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Cat n.º A9544) a los pocillos que recibieron anticuerpo de ensayo a una dilución de 1/20000 (100 µl/pocillo) durante 2 h 30 min a TA. A los pocillos, que recibieron mAb de ratón, se les añadió anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Cat n.º A7434) a una dilución de 1/10000 (100 µl/pocillo) durante 2 h 30 min a TA. Se añadió un anticuerpo de ratón anti-IgG de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Cat n.º A8062) a los anticuerpos de cabra a una dilución de 1/50000 (100 µl/pocillo) durante 2 h 30 min a TA. Las placas entonces se lavaron 4 veces y 100 µl del sustrato (comprimidos de fosfato de p-nitrofenilo; Sigma; 5 mg Cat n.º N9389; 20 mg Cat n.º N2765) disueltos en tampón de dietanolamina pH 9,8, para dar una concentración final de 1 mg/ml, se añadieron a cada pocillo.

Las placas se leyeron después de 30 min en un lector de microplacas Spectra Max M5 (Molecular Devices) usando filtros de 405 y 490 nm. Los valores son la media ± ETM de pocillos triplicados.

Resultados

Estos estudios muestran que XAB4 y XAB1 pueden unirse a IL-17A humana y de ratón, e IL-17A/F humana y de ratón. Además, se muestra que XAB4 puede unirse a IL-17A de macaco cangrejero y rata. No se detectó unión a IL-17F humana, de macaco cangrejero y ratón en estas condiciones experimentales, así como unión a otros miembros de la familia humana (IL-17B, IL-17C, IL-17D e IL-17E).

Tabla 22. Reactividad cruzada de XAB4 y XAB1 con miembros de la familia de IL-17 humana, de macaco cangrejero, ratón y rata, por ELISA.

	XAB4 (1 µg/ml) valor de D.O. (media ± ETM)	Anticuerpo de control (1 o 10 µg/ml) valor de D.O. (media ± ETM)	XAB1 (1 µg/ml) valor de D.O. (media ± ETM)	Anticuerpo de control (1 o 10 µg/ml) valor de D.O. (media ± ETM)
huIL-17A	2,471 ± 0,0448		1,302 ± 0,0554	
huIL-17A/F	2,137 ± 0,0429		1,222 ± 0,0202	
huIL-17F	0,049 ± 0,0056		0,032 ± 0,0005	1,913 ± 0,0483
huIL-17B	0,034 ± 0,0007	0,283 ± 0,0066	0,049 ± 0,0013	1,441 ± 0,0283
huIL-17C	0,036 ± 0,0002	0,290 ± 0,0027	0,032 ± 0,0002	0,558 ± 0,0169
huIL-17D	0,034 ± 0,0005	0,292 ± 0,0048	0,031 ± 0,0010	0,867 ± 0,0372
huIL-17E	0,035 ± 0,0014	0,833 ± 0,0239	0,033 ± 0,0003	2,054 ± 0,0378
maIL-17A	1,926 ± 0,0355			
maIL-17F	0,085 ± 0,0336			
IL-17A de ratón	1,585 ± 0,0428	1,086 ± 0,0119	1,439 ± 0,0354	3,697 ± 0,0602
IL-17A/F de ratón	2,263 ± 0,0243	1,142 ± 0,0315	1,762 ± 0,0097	2,084 ± 0,0223

IL-17F de ratón	0,098 ± 0,0060	1,294 ± 0,0134	0,044 ± 0,0008	1,770 ± 0,0302
IL-17A de rata	1,772 ± 0,1668			

Ejemplo 10. Reactividad cruzada con otras interleucinas humanas, de ratón y rata por ELISA

5 En otro conjunto de experimentos, se evaluó la reactividad cruzada de anticuerpos de la divulgación con citocinas humanas, de ratón o rata seleccionadas.

10 Los pocillos triplicados de placas de microvaloración de ELISA (placas Nunc Immuno MaxiSorp: Invitrogen Cat n.º 4-39454A) se recubrieron con 100 µl/pocillo de las siguientes citocinas: huIL1β recombinante (Novartis), huIL-3 recombinante (R&D Systems® Cat n.º 203-IL/CF), huIL-4 recombinante (R&D Systems® Cat n.º 204-IL/CF), huIL-6 recombinante (R&D Systems® Cat n.º 206-IL-1010/CF), huIL-8 recombinante (R&D Systems® Cat n.º 208-IL-010/CF), huIL-12 recombinante (R&D Systems® Cat n.º 219-IL-005/CF), huIL-13 recombinante (Novartis), huIL-17A recombinante (SEQ ID NO: 76), huIL-17A/F recombinante, huIL-17F recombinante (SEQ ID NO: 77), huIL-18 recombinante (MBL Cat n.º B003-5), huIL-20 recombinante (Novartis), huIL-23 recombinante (R&D Systems® Cat n.º 1290-IL-010/CF), huIFNγ recombinante (Roche), huTNFα recombinante (Novartis), huEGF recombinante (Sigma Cat n.º E9644), huTGFβ2 recombinante (Novartis), miL-1β recombinante (R&D Systems® Cat n.º 401-ML), miL-2 recombinante (R&D Systems® 402-ML-020/CF), miL-6 recombinante (R&D Systems® Cat n.º 406-ML-010/CF), miL-12 recombinante (R&D Systems® Cat n.º 419-ML-010/CF), miL-17A recombinante (SEQ ID NO: 83), miL-17A/F recombinante (R&D Systems® Cat n.º 5390-IL), miL-17F recombinante (R&D Systems® Cat n.º 2057-IL/CF), miL-18 recombinante (MBL Cat n.º B004-5), miL-23 recombinante (R&D Systems® Cat n.º 1887-ML), miFN-γ recombinante (R&D Systems® Cat n.º 485-MT), mTNFα recombinante (R&D Systems® Cat n.º 410-MT), IL-4 de rata recombinante (R&D Systems® Cat n.º 504-RL/CF), IL-6 de rata recombinante (R&D Systems® Cat n.º 506-RL-010), IL-12 de rata recombinante (R&D Systems® Cat n.º 1760-RL/CF), IL-17A de rata recombinante (SEQ ID NO: 85), IL-23 de rata recombinante (R&D Systems® Cat n.º 3136-RL-010/CF), TNFα de rata recombinante (R&D Systems® Cat n.º 510-RT/CF), a 1 µg/ml con la excepción de miL-6 recombinante, miL-12 recombinante y mTNFα recombinante que se recubrieron a 0,5 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin Ca y Mg (10x; Invitrogen Cat n.º 14200-083) NaN₃ al 0,02 % (Sigma Cat n.º S-8032) y se incubaron durante una noche a 4 °C.

20 El siguiente día, las placas de microvaloración se bloquearon con 300 µl de PBS/BSA al 2 % (fracción V; Roche Cat n.º 10 735 094 001)/NaN₃ al 0,02 % durante 1 h a 37 °C. Las placas entonces se lavaron 4 veces con PBS/Tween 20 al 0,05 % (Sigma Cat n.º P7949)/NaN₃ al 0,02 %.

30 Los anticuerpos de la divulgación se añadieron a 10 µg/ml (100 µl/pocillo) durante 3 h a temperatura ambiente. Para verificar el recubrimiento de antígenos en las placas, se usaron 100 µl/pocillo de los siguientes anticuerpos de control: un anticuerpo de ratón anti-huIL1β (R&D Systems® Cat n.º MAB601), un anticuerpo de ratón anti-huIL-3 (R&D Systems® Cat n.º MAB603), un anticuerpo de ratón anti-huIL-4 (R&D Systems® Cat n.º MAB604), un anticuerpo de ratón anti-huIL-6 (R&D Systems® Cat n.º MAB206), un anticuerpo de ratón anti-hu-IL8 (R&D Systems® Cat n.º MAB208), un anticuerpo de ratón anti-huIL-12 (R&D Systems® Cat n.º MAB219), un anticuerpo de ratón anti-huIL-13 (Novartis), un anticuerpo de ratón anti-huIL-17A (Novartis), un anticuerpo de ratón anti-huIL-17F (Novartis), un anticuerpo de ratón anti-huIL-18 (MBL Cat n.º D043-3), de ratón anti-huIL-20 (Abcam Cat n.º ab57227), un anticuerpo de cabra anti-huIL-23 (R&D Systems® Cat n.º AF1716), un anticuerpo de ratón anti-huIFN-γ (R&D Systems® Cat n.º MAB285), un anticuerpo de ratón anti-huTNF-α (R&D Systems® Cat n.º MAB610), un anticuerpo de ratón anti-hu-EGF (R&D Systems® Cat n.º MAB236), un anticuerpo humano anti-huTGFβ2 (Novartis), un anticuerpo de rata anti-miL-1β (R&D Systems® Cat n.º MAB401), un anticuerpo de rata anti-miL-2 (R&D Systems® Cat n.º MAB402), un anticuerpo de rata anti-miL-6 (R&D Systems® Cat n.º MAB406), un anticuerpo de rata anti-miL-12 (R&D Systems® Cat n.º MAB419), un anticuerpo de ratón anti-m/rataIL-17A (Novartis), un anticuerpo de rata anti-miL-17F (R&D Systems® Cat n.º MAB2057), un anticuerpo de rata anti-miL-18 (MBL Cat n.º D047-3), un anticuerpo de rata anti-miFN-γ (R&D Systems® Cat n.º MAB485), un anticuerpo de cabra anti-mTNFα (R&D Systems® Cat n.º AF-410-NA), un anticuerpo de ratón anti-IL-4 de rata (R&D Systems® Cat n.º MAB504), un anticuerpo de cabra anti-IL-6 de rata (R&D Systems® Cat n.º AF506), un anticuerpo de cabra anti-IL-12 de rata (R&D Systems® Cat n.º AF1760), un anticuerpo de ratón anti-IL-23 de rata (R&D Systems® Cat n.º MAB3510), un anticuerpo de ratón anti-TNFα de rata (R&D Systems® Cat n.º MAB510). Se añadieron a 1 o 5 µg/ml, en PBS, NaN₃ al 0,02 % durante 3 h a TA.

45 Las placas entonces se lavaron 4 veces con PBS/Tween 20 al 0,05 %/NaN₃ al 0,02 %. Después, se añadió un anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Cat n.º A9544) a los pocillos con anticuerpos humanos a una dilución de 1/20000 (100 µl/pocillo). Se añadió un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Cat n.º A1047) a los pocillos con anticuerpos de ratón a una dilución de 1/10000 (100 µl/pocillo). Se añadió un anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Cat n.º A7650) a los pocillos con anticuerpos de cabra a una dilución de 1/1000 (100 µl/pocillo) y un anticuerpo de conejo anti-IgG de rata conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Cat n.º A6066) a los pocillos con anticuerpos de rata a una dilución de 1/20 000 (100 µl/pocillo). Los anticuerpos secundarios se incubaron durante 2 h 30 min a TA. Las placas entonces se lavaron 4 veces y 100 µl del sustrato (comprimidos de fosfato de p-nitrofenilo; Sigma; 5 mg Cat n.º N9389 o 20 mg Cat n.º N2765) disueltos en tampón de dietanolamina pH 9,8, para dar una concentración final de 1 mg/ml, se añadieron a cada pocillo.

Las placas se leyeron después de 30 min a TA o activado a 4 °C en un lector de microplacas Spectra Max M5 (Molecular Devices) usando filtros de 405 y 490 nm. Los valores son la media ± ETM de pocillos triplicados.

5 *Resultados*

Los datos obtenidos muestran que tanto XAB4 como XAB1 son muy selectivos para IL-17A de origen humano, de ratón y rata y para IL-17A/F de origen humano y de ratón. Además, en las condiciones ensayadas, la reactividad de XAB1 a 10 µg/ml para IL-17F humana (no observada a 1 µg/ml, véase anteriormente) no se observa con XAB4. No se detectó reactividad para las otras citocinas ensayadas.

10

Tabla 23. Reactividad cruzada de XAB4 y XAB1 con citocinas humanas por ELISA.

	XAB4 (10 µg/ml) valor de D.O. (media ± ETM)	Anticuerpo de control (5 µg/ml) valor de D.O. (media ± ETM)	XAB1 (10 µg/ml) valor de D.O. (media ± ETM)	Anticuerpo de control (1 µg/ml) valor de D.O. (media ± ETM)
IL1β	0,015 ± 0,0075	0,867 ± 0,0107	-0,110 ± 0,0901	3,071 ± 0,0486
IL3	0,167 ± 0,1288	0,732 ± 0,0194	-0,049 ± 0,0738	2,931 ± 0,0779
IL4	0,047 ± 0,0089	0,806 ± 0,0617	0,057 ± 0,0458	2,555 ± 0,1499
IL6	-0,015 ± 0,0103	1,452 ± 0,2020	-0,044 ± 0,0838	2,976 ± 0,1025
IL8	0,018 ± 0,0078	3,130 ± 0,0109	0,058 ± 0,0431	3,153 ± 0,1228
IL12	0,009 ± 0,0058	0,853 ± 0,0496	-0,097 ± 0,1600	2,964 ± 0,1370
IL13	0,019 ± 0,0085	2,639 ± 0,0309	0,125 ± 0,0706	2,639 ± 0,0309
IL17A	3,178 ± 0,0697	3,136 ± 0,0644	2,745 ± 0,0879	2,731 ± 0,0850
IL17A/F	3,100 ± 0,0458	3,024 ± 0,0816	2,644 ± 0,2517	3,024 ± 0,0816
IL17F	0,035 ± 0,0138	3,114 ± 0,0672	0,613 ± 0,4162	3,185 ± 0,0110
IL18	-0,001 ± 0,0234	3,313 ± 0,2080	-0,086 ± 0,0170	3,313 ± 0,2080
IL20	0,039 ± 0,0117	3,039 ± 0,0671	0,335 ± 0,2442	3,118 ± 0,0252
IL23	-0,022 ± 0,0450	3,435 ± 0,0878	0,085 ± 0,0678	3,350 ± 0,0886
IFN-γ	0,048 ± 0,0676	3,419 ± 0,0404	0,059 ± 0,0511	3,236 ± 0,0312
TNF-α	0,009 ± 0,0197	3,373 ± 0,0550	0,289 ± 0,0318	3,275 ± 0,0440
EGF	0,126 ± 0,0858	3,432 ± 0,1050	0,062 ± 0,0427	3,233 ± 0,1126
TGFβ2	0,018 ± 0,0190	3,397 ± 0,0358	0,146 ± 0,0653	3,246 ± 0,0303
BSA	0,009 ± 0,0194	0,010 ± 0,0192	0,043 ± 0,0033	0,149 ± 0,0558

N.B. los valores negativos se deben al hecho de que se resta el blanco (valor de D.O. de los pocillos sin anticuerpos específicos).

15

Tabla 24. Reactividad cruzada de XAB4 y XAB1 con citocinas de ratón por ELISA.

	XAB4 (10 µg/ml) valor de D.O. (media ± ETM)	Anticuerpo de control (5 µg/ml) valor de D.O. (media ± ETM)	XAB1 (10 µg/ml) valor de D.O. (media ± ETM)	Anticuerpo de control (5 µg/ml) valor de D.O. (media ± ETM)
IL-1β	0,022 ± 0,0057	0,611 ± 0,0665	0,007 ± 0,0123	0,624 ± 0,0455
IL2	0,024 ± 0,0227	3,548 ± 0,1283	0,022 ± 0,0125	3,295 ± 0,0557
IL6	0,031 ± 0,0063	3,291 ± 0,0174	0,038 ± 0,0091	3,340 ± 0,1115
IL12	0,035 ± 0,0110	3,359 ± 0,0094	-0,005 ± 0,0121	3,295 ± 0,0331
IL17A	3,285 ± 0,0445	3,180 ± 0,0702	2,974 ± 0,0281	3,186 ± 0,0505
IL17A/F	3,342 ± 0,1047	3,407 ± 0,1102	3,169 ± 0,0340	3,214 ± 0,0145
IL17F	0,034 ± 0,0122	3,359 ± 0,0247	-0,058 ± 0,0326	3,264 ± 0,0309
IL18	0,054 ± 0,0149	2,650 ± 0,0227	0,022 ± 0,0123	2,572 ± 0,0145
IL23	0,058 ± 0,0139	0,601 ± 0,0314	0,009 ± 0,0007	0,590 ± 0,0378
IFN-γ	0,038 ± 0,0114	2,751 ± 0,0515	0,048 ± 0,0063	2,388 ± 0,2351
TNF-α	0,065 ± 0,0154	3,258 ± 0,1097	0,025 ± 0,0081	3,476 ± 0,0714
BSA	0,015 ± 0,0078	0,035 ± 0,0047	0,015 ± 0,0078	0,035 ± 0,0047

N.B. los valores negativos se deben al hecho de que se resta el blanco (valor de D.O. de los pocillos sin anticuerpos específicos).

20 **Tabla 25. Reactividad cruzada de XAB4 y XAB1 con citocinas de rata por ELISA.**

	XAB4 (10 µg/ml) valor de D.O. (media ± ETM)	Anticuerpo de control (5 µg/ml) valor de D.O. (media ± ETM)	XAB1 (10 µg/ml) valor de D.O. (media ± ETM)	Anticuerpo de control (5 µg/ml) valor de D.O. (media ± ETM)
IL4	0,026 ± 0,0082	3,168 ± 0,0297	0,017 ± 0,0092	3,324 ± 0,1092

IL6	0,021 ± 0,0028	3,116 ± 0,0318	0,000 ± 0,0141	3,253 ± 0,1078
IL12	0,009 ± 0,0113	3,185 ± 0,0921	-0,007 ± 0,0082	3,310 ± 0,0692
IL17A	3,483 ± 0,0910	3,156 ± 0,0890	1,202 ± 0,0136	3,359 ± 0,0670
IL23	0,023 ± 0,0050	3,380 ± 0,2127	0,011 ± 0,0010	3,199 ± 0,1078
TNF-α	0,020 ± 0,0104	3,346 ± 0,1376	0,003 ± 0,0029	3,159 ± 0,0854
BSA	0,015 ± 0,0078	0,035 ± 0,0047	0,015 ± 0,0078	0,035 ± 0,0047

N.B. los valores negativos se deben al hecho de que se resta el blanco (valor de D.O. de los pocillos sin anticuerpos específicos).

Ejemplo 11. Ensayo de inhibición de unión competitiva de IL-17A-IL-17RA y IL-17A/F-IL-17RA in vitro

5 Se usó IL-17RA humano como solución madre (BTP22599: 1,68 mg/ml = 46,2 μM). Se recubrieron placas de microvaloración de ELISA con IL-17RA humano (100 μl/pocillo, 1 μg/ml, ~27,5 nM) en PBS/NaN₃ al 0,02 % y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente. El siguiente día, las placas se bloquearon con 300 μl de PBS/BSA al 2 %/NaN₃ al 0,02 % durante 1 h a 37 °C. Las placas entonces se lavaron 4 veces con PBS/Tween20 al

10 0,05 %/NaN₃ al 0,02 %. Después de esta preparación, la valoración de las variantes de anticuerpo (50 μl, concentraciones de 12 nM a 0,12 nM para IL-17A y de 1200 nM a 40 nM para IL-17A/F, etapas de 3) se preincubaron con IL-17A humana-biotina (50 μl a 0,94 nM) o IL-17A/F (50 μl a 31 nM) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

15 Se añadieron 100 μl de la mezcla al pocillo durante 3 horas y 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS/Tween20 al 0,05 %/NaN₃ al 0,02 %, se añadieron cuatro veces de estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina a una dilución final de 1/10 000 (100 μl/pocillos). Después de 45 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron de nuevo 4 veces con PBS/Tween20 al 0,05 %/NaN₃ al 0,02 % y se añadió (100 μl/pocillo) el sustrato fosfato de p-nitrofenilo en tampón de dietanolamina pH 9,8 (1 mg/ml).

20 Las placas se leyeron después de 30 minutos en lector de microplacas Spectra Max M5, filtros 405 y 490 nm (triplicados). El cálculo del porcentaje de inhibición y la CI₅₀ para diferentes variantes de anticuerpo se hicieron usando un modelo logístico de cuatro parámetros (Excel Xlfit; FIT model 205).

Resultados

25 Los datos muestran que tanto XAB4 como XAB1 pueden bloquear la unión de huIL-17A y huIL-17A/F al huIL-17RA. La mayor afinidad de XAB4 por IL-17A e IL-17A/F se refleja en una capacidad inhibidora mayor. Los valores de CI₅₀ se presentan en la tabla. Las mayores concentraciones necesarias para bloquear la interacción de IL-17A/F-IL-17RA se explican principalmente por el hecho de que se usaban concentraciones aproximadamente 30 veces mayores de IL-17A/F en el ensayo. El anticuerpo se une a la subunidad A de A/F y, por lo tanto, no puede evitar la unión de la subunidad F al IL-17RA. Sin embargo, la unión de F a IL-17RA es bastante débil, en el intervalo de 300 nM.

Tabla 26. XAB4 y XAB1 inhiben la unión de huIL-17A y huIL-17A/F a huIL-17RA.

Interacción de ligando/receptor	XAB4 CI ₅₀ (nM) (media ± ETM)	XAB1 CI ₅₀ (nM) (media ± ETM)	Anticuerpo de control (nM)
huIL-17A\huIL-17RA	0,321 ± 0,037	0,830 ± 0,112	> 60
huIL-17A/F\huIL-17RA	153,9 ± 18,9	301,3 ± 51,9	

Ejemplo 12. Neutralización in vitro de la actividad de IL-17A e IL-17A/F humana por variantes de anticuerpo de la divulgación

(i) Ensayo en células C20A4Cl6 (línea celular de condrocitos humanos)

40 Células C20A4Cl6, o C-20/A4, clon 6 (Goldring MB, *et al.* 1994, J Clin Invest; 94:2307-16) se cultivaron en RPMI (Gibco Cat n.º 61870-010) complementado con suero bovino fetal al 10 % con IgG ultrabaja (Gibco Cat n.º 16250-078; lote 1074403), β-mercaptopetanol (5 x 10⁻⁵ M final) y Normocina (0,1 mg/ml; InvivoGen Cat n.º ant-nr-2).

45 Las células se desprendieron del plástico usando una solución de Accutase (PAA Cat n.º L11-007). Las células se distribuyeron en placas de microvaloración de 96 pocillos a una densidad de 5 x 10³ en pocillos de 100 μl en RPMI 1640 (Gibco Cat n.º 61870-010) sin suero bovino fetal, β-mercaptopetanol (5 x 10⁻⁵ M final) y Normocina (0,1 mg/ml).

50 Se permitió que las células C20A4Cl6 se adhirieran a las placas durante una noche. La siguiente mañana, diferentes concentraciones de huIL-17A recombinante (SEQ ID NO: 76; PM 32 000), huIL-17A/F recombinante (PM 32 800), huIL-17F recombinante (SEQ ID NO: 77; PM 30 000) o medio de control en presencia de TNFα humano (Novartis; PM 17 500) se añadieron en un volumen de 50 μl a pocillos triplicados en presencia de 50 μl de diferentes concentraciones de anticuerpo de ensayo (XAB4; XAB1), anticuerpo de control (Simulect® solución al 1,1 %, lote C0011; 831179) o

medio de control hasta alcanzar el volumen final de 200 µl/pocillo y la concentración final de suero bovino fetal al 0,5 %.

5 HuIL-17A (30 pM), huIL-17A/F (300 pM) y huIL-17F (10 nM) se añadieron junto con huTNFα (6 pM). XAB4 (PM 150 000) se añadió en un intervalo de concentración de 1 a 0,003 nM para neutralizar huIL-17A, en un intervalo de concentración de 10 a 0,03 nM para neutralizar huIL-17A/F y en un intervalo de concentración de 3 µM a 30 nM para huIL-17F. XAB1 (PM 150 000) se añadió en un intervalo de concentración de 3 a 0,01 nM para neutralizar huIL-17A, en un intervalo de concentración de 10 a 0,03 nM para neutralizar huIL-17A/F y en un intervalo de concentración de 3 µM a 30 nM para huIL-17F. Simulect® se añadió en un intervalo de concentración entre 3 µM y 100 nM. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron después de una incubación de 24 h y la producción de huIL-6 se midió por ELISA.

(ii) *Ensayo en células BJ (fibroblastos humanos)*

15 Células BJ (fibroblastos de piel humana de ATCC Cat n.º CRL 2522) se cultivaron en RPMI (Gibco Cat n.º 61870-010) complementado con suero bovino fetal al 10 % con IgG ultrabaja (Gibco Cat n.º 16250-078; lote 1074403), β-mercaptoetanol (5 x 10⁻⁵ M final) y Normocina (0,1 mg/ml; InvivoGen Cat n.º ant-nr-2). Las células se desprendieron del plástico usando una solución de Accutase (PAA Cat n.º L11-007).

20 Las células se distribuyeron en placas de microvaloración de 96 pocillos a una densidad de 5 x 10³ en pocillos de 100 µl en RPMI 1640 sin suero bovino fetal, β-mercaptoetanol (5 x 10⁻⁵ M final) y Normocina (0,1 mg/ml). Se permitió que las células BJ se adhirieran a las placas durante una noche. La siguiente mañana, diferentes concentraciones de rhIL-17A (SEQ ID NO: 76; PM 32 000), rhIL-17A/F (PM 32 800) y rhIL-17F (SEQ ID NO: 77; PM 30 000) o medio de control en presencia de TNFα humano (Novartis; PM 17 500) se añadieron en un volumen de 50 µl a pocillos triplicados en presencia de 50 µl de diferentes concentraciones de anticuerpo de ensayo (XAB4; XAB1), anticuerpo de control (Simulect® solución al 1,1 %, lote n.º C0011; 831179) o medio de control hasta alcanzar el volumen final de 200 µl/pocillo y la concentración final de suero bovino fetal al 2,5%.

30 HuIL-17A (30 pM), huIL-17A/F (300 pM) y huIL-17F (10 nM) se añadieron junto con huTNFα (6 pM). XAB4 (PM 150 000) se añadió en un intervalo de concentración de 1 a 0,003 nM para neutralizar huIL-17A, en un intervalo de concentración de 10 a 0,03 nM para neutralizar huIL-17A/F y en un intervalo de concentración de 3 µM a 30 nM para huIL-17F. XAB1 (PM 150 000) se añadió en un intervalo de concentración de 3 a 0,01 nM para neutralizar huIL-17A, en un intervalo de concentración de 10 a 0,03 nM para neutralizar huIL-17A/F y en un intervalo de concentración de 3 µM a 30 nM para huIL-17F. Simulect® se añadió en un intervalo de concentración entre 3 µM y 100 nM. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron después de una incubación de 24 h y la producción de huIL-6 y huGROα se midió por ELISA.

(iii) *Ensayos de detección*

40 **1) ELISA para detección de producción de IL-6 humana**

Se recubrieron placas de microvaloración de ELISA con un mAb de ratón anti-IL-6 humana (R&D Systems® Cat n.º MAB206; 100 µl/pocillo a 1 µg/ml) en PBS con NaN₃ al 0,02 % y se incubaron durante una noche a +4 °C. El siguiente día, las placas de microvaloración se bloquearon con 300 µl de PBS/BSA al 2 %/NaN₃ al 0,02 % durante 3 h a temperatura ambiente. Las placas entonces se lavaron 4 veces con PBS/Tween20 al 0,05 %/NaN₃ al 0,02 %. Se añadieron los sobrenadantes de cultivo de C20A4Cl6 (dilución final 1:5 para cultivos estimulados con huIL-17A más huTNFα, o 1:2 para cultivos estimulados con huTNFα más huIL-17A/F o IL-17F; 100 µl/pocillo) o células BJ (dilución final 1:10 para cultivos estimulados con huIL-17A más huTNFα, o 1:5 para cultivos estimulados con huTNFα más huIL-17A/F o IL-17F; 100 µl/pocillo).

50 Para establecer una curva de valoración, rhIL-6 (Novartis; 100 µl/pocillo) se valoró desde 500 pg/ml hasta 7,8 pg/ml en etapas de dilución 1:2. Después de una incubación durante una noche a temperatura ambiente, las placas se lavaron 4 veces con PBS/Tween 20 al 0,05 %/NaN₃ al 0,02 %. Se añadió un anticuerpo de cabra anti-IL-6 humana conjugado con biotina (R&D Systems® Cat n.º BAF206; 30 ng/ml; 100 µl/pocillo). Las muestras se dejaron reaccionar durante 4 h a temperatura ambiente. Después del lavado (4 veces), se añadió estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch Cat n.º 016-050-084) a una dilución final de 1/10 000 (100 µl/pocillo).

60 Después de 40 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron de nuevo 4 veces. Se disolvieron comprimidos de sustrato de fosfato de p-nitrofenilo (Sigma; 5 mg, Cat n.º N9389; 20 mg, Cat n.º N2765) en tampón de dietanolamina pH 9,8 para dar una concentración final de 1 mg/ml. Se añadieron 100 µl a cada pocillo y se leyó la D.O. después de 1 h en un lector de microplacas Spectra Max M5 (Molecular Devices) usando filtros de 405 y 490 nm.

2) ELISA para detección de producción de GRO α humana

5 Se recubrieron placas de microvaloración de ELISA con un mAb de ratón anti-GRO α humana (R&D Systems® Cat n.º MAB275; 100 μ l/pocillo a 1,5 μ g/ml) en PBS/NaN₃ al 0,02 % y se incubaron durante una noche a 4 °C. El siguiente día, las placas de microvaloración se bloquearon con 300 μ l de PBS/BSA al 2 %/NaN₃ al 0,02 % durante 3 h a temperatura ambiente. Las placas entonces se lavaron 4 veces con PBS/Tween20 al 0,05 %/NaN₃ al 0,02 %. Se añadieron los sobrenadantes de cultivo de células BJ (dilución final 1:2; 100 μ l/pocillo).

10 Para establecer la curva de valoración, se valoró GRO α humana (R&D Systems® Cat n.º 275-GR/CF; 100 μ l/pocillo) desde 2 ng/ml hasta 0,03 ng/ml en etapas de dilución 1:2.) Después de una incubación durante una noche a temperatura ambiente, las placas se lavaron 4 veces con PBS/Tween 20 al 0,05 %/NaN₃ al 0,02 %.

15 Se añadió un anticuerpo de cabra anti-GRO α humana conjugado con biotina (R&D Systems® Cat n.º BAF275; 100 ng/ml; 100 μ l/pocillo). Las muestras se dejaron reaccionar durante 4 h a temperatura ambiente. Después del lavado (4 veces), se añadió estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch Cat n.º 016-050-084) a una dilución final de 1/10 000 (100 μ l/pocillo). Después de 40 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron de nuevo 4 veces. Se disolvieron comprimidos de sustrato de fosfato de p-nitrofenilo (Sigma; 5 mg, Cat n.º N9389; 20 mg, Cat n.º N2765) en tampón de dietanolamina pH 9,8 para dar una concentración final de 1 mg/ml. Se añadieron 20 100 μ l a cada pocillo y se leyó la D.O. después de 1 h en un lector de microplacas Spectra Max M5 (Molecular Devices) usando filtros de 405 y 490 nm.

3) Cálculos

25 Los datos se presentan como la media +/- ETM. Se usó un ajuste de curva de cuatro parámetros para los cálculos del ELISA. Los valores de CI₅₀ para la inhibición de la secreción de IL-6 y GRO- α por los anticuerpos se calcularon usando Xlfit (FIT modelo 205).

(iv) Resultados

30

1) Ensayo en células C20A4C16 (línea celular de condrocitos humanos)

35 Tanto XAB4 como XAB1 podían neutralizar la inducción de secreción de hIL-6 por células C20A4C16 estimuladas con rhIL-17A y rhIL-17A/F en presencia de rhuTNF α . El anticuerpo de control (Simulect®) a 100 nM no tiene efecto. Los valores de CI₅₀ (media \pm ETM) para XAB4 y XAB1 se presentan en la tabla 27. No se observa inhibición sobre hIL-17F incluso a concentraciones de Ab de 3 μ M.

Tabla 27. Efectos inhibidores de XAB4 y XAB1 sobre la secreción de hIL-6 por células C20A4C16.

Estímulos	XAB4 CI ₅₀ (nM) (media \pm ETM)	XAB1 CI ₅₀ (nM) (media \pm ETM)	Anticuerpo de control (nM)
rhIL-17A (1 nM) ^a	0,44 \pm 0,06		>100
rhIL-17A/F (3 nM) ^a	1,30 \pm 0,18		>100
rhIL-17F (30 nM) ^a	>3000		>1000
rhIL-17A (30 pM) + rhuTNF- α (6 pM) ^b	0,024 \pm 0,004	1,21 \pm 0,09	>3000
rhIL-17A/F (300 pM) + rhuTNF- α (6 pM) ^b	0,108 \pm 0,02	>10	>3000
rhIL-17F (10 nM) + rhuTNF- α (6 pM) ^b	>3000	>3000	>3000

^a Se resta el fondo de producción de hIL-6 sin estimulación (0,13 \pm 0,003)

40 ^b Se resta el fondo de producción de hIL-6 en cultivos con TNF en solitario (0,20 \pm 0,003)

A partir de estos experimentos es evidente que el anticuerpo XAB1 precursor comparte la actividad neutralizante con sus derivados. También se observa que la variante XAB4 tiene una mayor actividad neutralizante que XAB1.

45 En un experimento adicional, análogo al experimento descrito anteriormente, todos los anticuerpos XAB1-XAB5 se compararon, como se observa en

la tabla 28. Aquí puede observarse que los perfiles de inhibición para XAB2, XAB3 y XAB5 son comparables a los observados para XAB4 y XAB1, especialmente para XAB4.

50 **Tabla 28. Tabla de efectos inhibidores de anticuerpos XAB sobre la secreción de hIL-6 por células C20A4C16.**

Estímulos	XAB1 CI ₅₀ (nM)	XAB2 CI ₅₀ (nM)	XAB3 CI ₅₀ (nM)	XAB4 CI ₅₀ (nM)	XAB5 CI ₅₀ (nM)
-----------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------

	Media ± ETM				
rhIL-17A (0,5 nM) ^a	0,29 ± 0,03	0,72 ± 0,08	0,63 ± 0,15	0,51 ± 0,04	0,55 ± 0,01

^a Se resta el fondo de producción de hUL-6 sin estímulos (0,04 ± 1,13 ng/ml).

2) Ensayo en células BJ (fibroblastos humanos)

- 5 Tanto XAB4 como XAB1 neutralizan la inducción de secreción de hUL-6 y huGRO α por células BJ estimuladas con rhIL-17A y rhIL-17A/F en presencia de huTNF α . El anticuerpo de control (Simulect®) a 100 nM no tiene efecto. Los valores de CI₅₀ para la inhibición de IL-6 y huGRO α se presentan en

10 la tabla 29 y tabla 30. No se observa inhibición sobre hUL-17F incluso a concentraciones de Ab de 3 μ M. A partir de estos experimentos es evidente que el anticuerpo XAB1 precursor comparte la actividad neutralizante con sus derivados.

También se observa que la variante XAB4 tiene una mayor actividad neutralizante que XAB1.

15 **Tabla 29. Efecto inhibitor de XAB4 y XAB1 sobre la secreción de hUL-6 por células BJ.**

Estímulos	XAB4 CI50 (nM) Media ± ETM	XAB1 CI50 (nM) Media ± ETM	Anticuerpo de control (nM)
rhIL-17A (1 nM) ^a	0,63 ± 0,02		>100
rhIL-17A/F (3 nM) ^a	1,68 ± 0,05		>100
rhIL-17F (30 nM) ^a	>3000		>1000
rhIL-17A (30 pM) + rhuTNF- α (6 pM) ^b	0,012 ± 0,002	0,47 ± 0,02	>3000
rhIL-17A/F (300 pM) + rhuTNF- α (6 pM) ^b	0,17 ± 0,01	3,83 ± 0,63	>3000
rhIL-17F (10 nM) + rhuTNF- α (6 pM) ^b	>3000	>3000	>3000

^a Se resta el fondo de producción de hUL-6 sin estímulos (0,32 ± 0,002 ng/ml).

^b Se resta el fondo de producción de hUL-6 en cultivos estimulados con TNF en solitario (0,45 ± 0,02 ng/ml)

Tabla 30. Efecto inhibitor de XAB4 y XAB1 sobre la secreción de hu-GRO-alfa por células BJ.

Estímulos	XAB4 CI50 (nM) Media ± ETM	XAB1 CI50 (nM) Media ± ETM	Anticuerpo de control (nM)
IL-17A (1 nM) ^a	0,35 ± 0,01		>100
IL-17A/F (3 nM) ^a	1,11 ± 0,05		>100
IL-17F (30 nM) ^a	>3000		>1000
IL-17A (30 pM) + TNF- α (6 pM) ^b	0,007 ± 0,0004	0,72 ± 0,12	>3000
IL-17A/F (300 pM) + TNF- α (6 pM) ^b	0,1 ± 0,01	6,22 ± 0,44	>3000
IL-17F (10 nM) + TNF- α (6 pM) ^b	>3000	>3000	>3000

20 ^a Se resta el fondo de producción de GRO α sin estímulos (0,03 ± 0,01 ng/ml).

^b Se resta el fondo de producción de GRO α en cultivos con TNF en solitario (0,15 ± 0,008 ng/ml)

En experimentos adicionales, análogos a los experimentos descritos anteriormente, todos los anticuerpos XAB1-XAB5 se compararon, como se observa en la tabla 31 y tabla 32. Aquí puede observarse que los perfiles de inhibición para XAB2, XAB3 y XAB5 son comparables a los observados para XAB4 y XAB1, especialmente para XAB4.

25 **Tabla 31. Efectos inhibitor de anticuerpos XAB sobre la secreción de hUL-6 por células BJ.**

Estímulos	XAB1 CI50 (nM) Media ± ETM	XAB2 CI50 (nM) Media ± ETM	XAB3 CI50 (nM) Media ± ETM	XAB4 CI50 (nM) Media ± ETM	XAB5 CI50 (nM) Media ± ETM
rhIL-17A (0,5 nM) ^a	4,97 ± 0,59	0,64 ± 0,22	0,50 ± 0,002	0,55 ± 0,04	0,54 ± 0,02

^a Se resta el fondo de producción de hUL-6 sin estímulos (0,15 ± 4,06 ng/ml)

Tabla 32. Efectos inhibidores de anticuerpos XAB sobre la secreción de huGRO α por células BJ.

Estímulos	XAB1 CI50 (nM) Media \pm ETM	XAB2 CI50 (nM) Media \pm ETM	XAB3 CI50 (nM) Media \pm ETM	XAB4 CI50 (nM) Media \pm ETM	XAB5 CI50 (nM) Media \pm ETM
rhIL-17A (0,5 nM) ^a	1,39 \pm 0,07	0,40 \pm 0,06	0,42 \pm 0,01	0,44 \pm 0,04	0,46 \pm 0,05

^a Se resta el fondo de producción de HuGRO α sin estímulos (0,03 \pm 0,02 ng/ml)

5 **Ejemplo 13. Neutralización in vitro de la actividad de IL-17A e IL-17A/F de ratón por variantes de anticuerpo de la divulgación**

10 Células CMT-93 (ATCC CCL-223) se cultivaron en RPMI (Gibco Cat n.º 61870-010) complementado con suero bovino fetal al 10 % con IgG ultrabaja (Gibco Cat n.º 16250-078; lote 1074403), β -mercaptoetanol (5 x 10⁻⁵ M final) y Normocina (0,1 mg/ml; InvivoGen Cat n.º ant-nr-2).

15 Las células se desprendieron del plástico usando una solución de Accutase (PAA Cat n.º L11-007) y se distribuyeron en placas de microvaloración de 96 pocillos a una densidad de 5 x 10³ en pocillos de 100 μ l en RPMI 1640 sin suero bovino fetal, β -mercaptoetanol y normocina.

20 Se permitió que las células se adhirieran a las placas durante una noche. La siguiente mañana, rmlL-17A (SEQ ID NO: 83, PM 31 000) a 1 nM, rmlL-17A/F (R&D Systems® Cat n.º 5390-IL; PM 30 400) a 3 nM, rmlL-17F (SEQ ID NO: 84; PM 30 000) a 30 nM, rIL-17A de rata (SEQ ID NO: 85; PM 31 000) a 1 nM o medio de control se añadieron en un volumen de 50 μ l a pocillos triplicados en presencia de 50 μ l de diferentes concentraciones de anticuerpos de ensayo (XAB4 o XAB1), anticuerpos de control (Simulect® solución al 1,1 %; C0011, 831179) o medio de control hasta alcanzar el volumen final de 200 μ l/pocillo y la concentración final de suero bovino fetal al 1 %.

25 Los sobrenadantes de cultivo se recogieron después de una incubación de 24 h y la producción de KC se midió por ELISA.

(i) *ELISA para detección de producción de KC de ratón*

30 Se recubrieron placas de microvaloración de ELISA con un mAb de rata anti-KC de ratón (R&D Systems® Cat n.º MAB453; 100 μ l/pocillo a 1 μ g/ml) en PBS/NaN₃ al 0,02 % y se incubaron durante una noche a 4 °C. El siguiente día, las placas de microvaloración se bloquearon con 300 μ l de PBS/BSA al 2 %/NaN₃ al 0,02 % durante 3 h a temperatura ambiente. Las placas entonces se lavaron 4 veces con PBS/Tween20 al 0,05 %/NaN₃ al 0,02 %. Se añadieron los sobrenadantes de cultivo de células CMT-93 (dilución final 1:5; 100 μ l/pocillo).

35 Para establecer la curva de valoración, se valoró KC de ratón (R&D Systems® n.º 453-KC; 100 μ l/pocillo) desde 1 ng/ml hasta 0,016 ng/ml en etapas de dilución 1:2. Después de una incubación durante una noche a temperatura ambiente, las placas se lavaron 4 veces con PBS/Tween 20 al 0,05 %/NaN₃ al 0,02 %. Se añadió un anticuerpo de cabra anti-KC de ratón conjugado con biotina (R&D Systems® Cat n.º BAF453; 100 μ l/pocillo) a 0,1 μ g/ml. Las muestras se dejaron reaccionar durante 4 h a temperatura ambiente. Después del lavado (4 veces), se añadió estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch Cat n.º 016-050-084) a una dilución final de 1/10 000 (100 μ l/pocillo). Después de 40 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron de nuevo 4 veces. Se disolvieron comprimidos de sustrato de fosfato de p-nitrofenilo (Sigma; 5 mg, Cat n.º N9389; 20 mg, Cat n.º N2765) en tampón de dietanolamina pH 9,8 para dar una concentración final de 1 mg/ml. Se añadieron 100 μ l de sobrenadantes de cultivo a cada pocillo y se leyó la D.O. después de 1 h en un lector de microplacas Spectra Max M5 (Molecular Devices) usando filtros de 405 y 490 nm.

(ii) *Cálculos*

50 Los datos se presentan como la media \pm ETM. Se usó un ajuste de curva de cuatro parámetros para los cálculos del ELISA. Los valores de CI₅₀ para la inhibición de la secreción de KC por los anticuerpos se calcularon usando Xlfit™ (FIT modelo 205).

(iii) *Resultados*

55 Tanto XAB4 como XAB1 pueden neutralizar la inducción de secreción de KC de ratón por células CMT-93 estimuladas con IL-17A de ratón o rata e IL-17A/F de ratón. El anticuerpo de control (Simulect®) no tiene efecto. Los valores de CI₅₀ (media \pm ETM) para XAB4 y XAB1 se presentan en la tabla 33. No se observa inhibición sobre huIL-17F incluso a concentraciones de Ab de 10 μ M.

Tabla 33. Efecto inhibidor de XAB4 y XAB1 sobre la secreción de KC de ratón por células CMT-93.

Estímulos	CI50 (nM) de XAB4	CI50 (nM) de XAB1	Anticuerpo de control
-----------	-------------------	-------------------	-----------------------

	Media ± ETM	Media ± ETM	(nM)
mIL-17A (1 nM) ^a	13,8 ± 0,48	539 ± 29,4	>3000
mIL-17A/F (3 nM) ^a	10,3 ± 1,06	>1000	>3000
mIL-17F (30 nM) ^a	>10000	>10000	>3000
rIL-17A (1 nM) ^a	6,7 ± 0,84	467 ± 25,1	>3000

^a Se resta el fondo de producción de KC sin estímulos (0,07 ± 0,001 ng/ml).

A partir de estos experimentos es evidente que tanto el anticuerpo XAB1 precursor, como sus derivados, tienen actividad neutralizante. También se observa que la variante XAB4 tiene una mayor actividad neutralizante que XAB1.

5 En un experimento adicional, análogo al experimento descrito anteriormente, todos los anticuerpos XAB1-XAB5 se compararon, como se observa en la tabla 34. Aquí puede observarse que los perfiles de inhibición para XAB2, XAB3 y XAB5 son comparables a los observados para XAB4 y XAB1, especialmente para XAB4.

10 **Tabla 34 Efectos inhibidores de anticuerpos XAB sobre la secreción de KC por células CMT-93.**

Estímulos	XAB1	XAB2	XAB3	XAB4	XAB5
	CI50 (nM) Media ± ETM				
mIL-17A (0,15 nM) ^a	128 ± 14,2	20,9 ± 0,96	<1	7,0 ± 0,29	7,8 ± 0,78

^a Se resta el fondo de producción de KC sin estímulos (0,19 ± 5,81 ng/ml).

Ejemplo 14. Ensayo de reumatismo articular inducido por antígeno en ratas (AIA en ratas)

15 Se sensibilizaron ratas Lewis hembra (120-150 g) por vía intradérmica en el lomo en dos sitios con seroalbúmina bovina metilada (mBSA) homogeneizada 1:1 con adyuvante completo de Freund en los días -21 y -14 (0,1 ml que contienen 5 mg/ml de mBSA). En el día 0, las ratas se anestesiaron usando una mezcla de isoflurano al 5 %/aire y se mantuvieron usando isoflurano al 3,5 % mediante máscara facial durante las inyecciones intraarticulares. La rodilla derecha recibió 50 µl de 10 mg/ml de mBSA en solución de glucosa al 5 % (rodilla a la que se ha inyectado antígeno), mientras que la rodilla izquierda recibió 50 µl de solución de glucosa al 5 % en solitario (rodilla a la que se ha inyectado vehículo). Entonces se midieron los diámetros de las rodillas izquierda y derecha usando calibres inmediatamente después de las inyecciones intraarticulares y de nuevo en los días 2, 4 y 7.

25 Los tratamientos se administraron mediante una sola inyección subcutánea en el día -3. El anticuerpo de la divulgación se inyectó a 0,15, 1,5, 15 y 116 mg/kg. Se calculó la inflamación de la rodilla derecha como una relación de la inflamación de la rodilla izquierda, y la relación de la inflamación de la rodilla I/D se representó frente al tiempo para dar gráficos de área bajo la curva (ABC) para los grupos de control y tratamiento. Las inhibiciones porcentuales de los animales individuales en las ABC de cada grupo de tratamiento se calcularon frente a la ABC del grupo de control (inhibición del 0 %) usando una hoja de cálculo de Excel.

Resultados

35 Los resultados se muestran en la tabla 35. La inhibición relacionada con la dosis de la inflamación de la rodilla derecha se demostró para XAB4 con una DE₅₀ calculada de 1,68 mg/kg s.c.

Tabla 35. Efectos de tratamiento de una sola dosis con XAB4 sobre la inflamación de rodilla desde el día 0 hasta el día 7 en rata Lewis con reumatismo articular inducido por antígeno.

Dosis de anticuerpo (mg/kg)	ABC del porcentaje de inhibición de inflamación de rodilla
0,15	18,46 ± 1,61*
1,5	65,76 ± 3,41**
15	71,59 ± 1,27**
116	77,01 ± 1,72**

Los datos puntuales representan la media ± ETM de n = 5 animales. * p<0,05 y ** p<0,01 ANOVA seguido de ensayo de Dunnett frente a la curva de control.

40 Asimismo, la inhibición relacionada con la dosis de inflamación de la rodilla se demostró para XAB4 en un modelo usando ratas Wistar (datos no mostrados) y en un modelo que usa modelo de reumatismo articular inducido por antígeno en ratones (datos no mostrados).

Ejemplo 15. Modelo mecánico de angiogénesis

45 Cámaras que contienen IL-17A humana (entre 150 y 200 ng), cuando se colocan por vía subcutánea en un ratón, causan crecimiento de nuevos vasos sanguíneos alrededor del implante. La cantidad de angiogénesis se correlaciona con el peso del tejido recién formado en esta zona. El tratamiento profiláctico con XAB4 a 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1 y 3

mg/kg inhibió la angiogénesis inducida por IL-17 humana. Las 5 dosis mayores dieron lugar todas a una inhibición potente y significativa del peso de la cámara de tejido. Las 4 dosis mayores no mostraron dependencia de la dosis, sin embargo, la dosis de 0,03 mg/kg fue menos eficaz que las dosis de 0,1 mg/kg y anteriores.

- 5 Este estudio demuestra que el potente efecto angiogénico de IL-17A puede neutralizarse con un anticuerpo anti-IL-17A y proporciona evidencias experimentales de la eficacia de XAB4 para IL-17A humana *in vivo*.

Ejemplo 16. Modelo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE)

- 10 El modelo de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) es un modelo en animales conocido para esclerosis múltiple (revisado, por ejemplo, en Constantinescu *et al.*, Br J Pharmacol 2011). Se ha demostrado que la inhibición de IL-17 reduce la gravedad de EAE en ratones C57Bl/6 (Haak S *et al.* 2009, JCI; 119:61-69).

- 15 Se inmunizaron ratones C57Bl/6 hembra (edad de 9 semanas, Harlan, Alemania) con una mezcla 50/50 de péptido glucoproteínico recombinante de oligodendrocitos de mielina de rata (MOG₁₋₁₂₅) (generado en el propio laboratorio) y adyuvante completo de Freund (CFA, generado añadiendo 8 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37RA (Difco) a adyuvante incompleto de Freund (IFA, Sigma). La inmunización se realizó por inyección subcutánea con 200 µg/animal de MOG₁₋₁₂₅ en la base de la cola en el día 0. Además, se inyectaron 200 ng/animal de toxina pertúsica (PT) por vía intraperitoneal en los días 0 y 2.

- 20 Se ensayó tanto el efecto del tratamiento terapéutico como el efecto del tratamiento profiláctico de XAB4.

Tratamiento terapéutico

- 25 Para el tratamiento terapéutico, se usaron 16 ratones (8 para XAB4 y 8 para el control). El tratamiento se inició una vez que los animales tenían una puntuación clínica de al menos 2,5 (debilidad de la extremidad posterior grave) durante 3 días. Después de esto, se inyectaron 15 mg/kg de XAB4 o anticuerpo de control de isotipo por vía subcutánea cada semana con una sola dosis.

- 30 Los resultados se muestran en las figuras 11 a 15 (d.p.i es días después de la inmunización). En todas las figuras, XAB4 se representa por círculos y el control de isotipo se representa por cuadrados. La puntuación terapéutica (media + ETM) se muestra en la figura 11. Se observa claramente que los animales tratados con XAB4 tienen una puntuación clínica media inferior al control de isotipo. La figura 12 muestra el cambio de peso (%) para los dos grupos de ratones, y la figura 13 muestra las puntuaciones terapéuticas acumuladas. Las figuras 14 y 15 son comparaciones de la puntuación terapéutica antes y después del tratamiento. Se observa claramente en todos los gráficos que XAB4 tiene un efecto terapéutico en comparación con el control de isotipo. Por tanto, el tratamiento terapéutico con XAB4 reducía significativamente la gravedad de EAE.

Tratamiento profiláctico

- 40 Para el tratamiento profiláctico, se usaron 19 ratones (10 para XAB4 y 9 para el control). Cada animal se trató un día antes de la inmunización con 15 mg/kg de XAB4 o control de isotipo, mediante una sola inyección subcutánea. Después de esto, se inyectaron 15 mg/kg de XAB4 o anticuerpo de control de isotipo por vía subcutánea cada semana con una sola dosis.

- 45 Los resultados se muestran en las figuras 16 a 20 (d.p.i es días después de la inmunización). En las figuras 16 a 19, XAB4 se representa por círculos rellenos y el control de isotipo se representa por cuadrados vacíos. La puntuación profiláctica (media + ETM) se muestra en la figura 16. Se observa claramente que los animales tratados con XAB4 tienen una puntuación clínica media inferior. La figura 17 muestra el cambio de peso (%) para los dos grupos de ratones, y la figura 18 muestra las puntuaciones profilácticas acumuladas. La puntuación profiláctica máxima se observa en la figura 19. Se observa claramente en todos los gráficos que XAB4 tiene un efecto en comparación con el control de isotipo. Además, en la figura 20, donde XAB4 se representa mediante una línea continua y el control de isotipo se representa mediante una línea discontinua, se observa que la aparición de EAE es posterior para el grupo de ratones tratado con XAB4, en comparación con el grupo de ratones tratado con control de isotipo.

- 55 Por tanto, se muestra que el tratamiento profiláctico con XAB4 retardaba significativamente la aparición de EAE y reducía la gravedad de EAE.

Ejemplo 17. Atenuación de los niveles de IL6, CXCL1, IL-8, GM-CSF y CCL2 inducida por IL17A en astrocitos humanos

- 60 Se investigaron los efectos de XAB4 sobre los niveles de IL-6, CXCL1, IL-8, GM-CSF y CCL2 en astrocitos aislados de la corteza cerebral del cerebro humano. Los astrocitos liberan varios factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas que les permite regular la comunicación, migración y supervivencia celular de células neuronales, de la glía e inmunitarias. La comunicación directa de la base final astrocítica con las células endoteliales también permite

que los astrocitos controlen la función de la barrera hematoencefálica. Además, los astrocitos liberan y captan neurotransmisores, tales como glutamato, en la hendidura sináptica que les permite regular la transmisión sináptica y la excitotoxicidad. Es importante que los astrocitos forman patologías de cicatrización después de lesión del SNC, teniendo, por tanto, funciones opuestas aparentes en fisiología normal y fisiopatología. En enfermedad, se sugiere que los astrocitos desempeñan funciones en una serie de trastornos psiquiátricos, neurológicos y neurodegenerativos, donde su función en la neuroinflamación probablemente es importante.

Los datos mostraron que la coestimulación con IL-17A y TNF α potenciaba la liberación de IL-6, CXCL1, IL-8, GM-CSF y CCL2, y que XAB4 inhibía los niveles de IL-6, CXCL1, IL-8, GM-CSF y CCL2 en astrocitos humanos. Estos datos indican una función dominante para IL-17A en la liberación de citocinas desde los astrocitos y respaldan su uso como dianas farmacéuticas para enfermedades neuroinflamatorias. Es destacable que el pretratamiento de astrocitos humanos con XAB4 inhibía los niveles inducidos por IL-17A e inducidos por IL-17A/TNF α , de IL-6, CXCL1, IL-8, GM-CSF y CCL2, sin afectar a los inducidos por TNF α . Conjuntamente, los datos sugirieron que la inhibición selectiva de la señalización de IL-17A con XAB4 atenúa el nivel de citocinas proinflamatorias en astrocitos humanos. En enfermedad, se sugiere que los astrocitos desempeñan funciones en una serie de trastornos psiquiátricos, neurológicos y neurodegenerativos, donde su función en la neuroinflamación probablemente es importante. Por tanto, fármacos novedosos que alteren la función de los astrocitos son de posible valor, donde la regulación de la función de los astrocitos puede demostrar ser terapéuticamente útil. Por consiguiente, como se demostró que XAB4 tiene un efecto sobre la producción de IL-6, CXCL1, IL-8, GM-CSF y CCL2 de los astrocitos, puede concluirse que XAB4 puede ser un agente terapéutico útil, tal como para el tratamiento de esclerosis múltiple (EM).

Materiales y métodos

Todas las citocinas se adquirieron de R&D Systems. Basiliximab (Novartis, Basilea, Suiza) se usó como control de isotipo. Los anticuerpos primarios usados fueron: anti-IL17RA Alexa Fluor 647 (BG/hIL17AR, Biolegend), anti-IL17RC Alexa Fluor 488 (309822, R&D Systems, R.U.), anti-p65 (Santa Cruz, EE. UU.), IgG de ratón Alexa Fluor 647 (MOPC-21, Biolegend, R.U.), IgG de ratón Alexa Fluor 488 (133303, R&D System, R.U.), IgG de ratón Biotina (G155-178, BD Biosciences, Suiza) e IgG de rata PE (A95-1, BD Biosciences, Suiza). Los anticuerpos secundarios y tintes usados fueron: anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo biotinilado (BA1000, Vector, R.U.), conjugado con estreptavidina Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 633 (S11223 y S2137, Life Technology, EE. UU.), anticuerpo de cabra contra ratón Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 633 (A1101 y A21050, Life Technology, EE. UU.), estreptavidina BV421 (405226, Biolegend, R.U.), Hoechst 34580 (H21486, Life Technology, EE. UU.).

Astrocitos humanos derivados de corteza cerebral se adquirieron de ScienCell Research Laboratory (EE. UU.) (número de catálogo 1800). Las células se cultivaron según las instrucciones del proveedor. En resumen, las células se cultivaron en medio de astrocitos humanos (ScienCell número del catálogo 1801) complementado con complemento de crecimiento de astrocitos al 1 % (ScienCell número del catálogo 1852), suero bovino fetal al 5 % (ScienCell número del catálogo 0010) y penicilina al 1 %/estreptomina (ScienCell número del catálogo 0503). Las células se mantuvieron en matraces de cultivo T75 a un 5 % de CO₂ y 37 °C con los medios cambiados cada tres días hasta confluencia de un 80 %. Para todos los tratamientos, se sembraron 70 000 células en placas de 24 pocillos, se cultivaron durante 3 días, se privaron de suero durante 2-4 h, después de ello los astrocitos se trataron durante 2 h con XAB4, y después de ello se trataron durante 18-20 h con citocinas humanas recombinantes como se indica en las leyendas de las figuras. Los sedimentos celulares se usaron para cuantificar los niveles de ARNm de las citocinas mediante qPCR y los sobrenadantes se usaron para cuantificar los niveles de proteína de las citocinas por HTRF (Cisbio, Francia, usado para IL-6, IL-8 y CXCL1) o AlphaLISA (PerkinElmer, EE. UU., usado para CCL2 y GM-CSF).

La medición de ARN de citocina se realizó por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR). En resumen, los astrocitos se lisaron durante 5 min a temperatura ambiente mediante agitación suave en 350 μ l de tampón de lisis (tampón RLT con β -mercaptoetanol al 1 %) y el ARN total se extrajo usando Microkit RNeasy (74004, Qiagen, Suiza). El ADNc se sintetizó usando transcriptasa inversa SuperScript III (18080-400, Life Technology, Suiza). El nivel de expresión de cada gen se evaluó por q-PCR en una máquina de PCR en tiempo real Viia7 (Life Technology, Suiza). Se adquirieron sondas Taqman de Life Technology, Suiza. Cada muestra se analizó por triplicado y se normalizó a hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT). Los niveles de proteína humana IL6, IL8, CXCL1 (ng/ml) en sobrenadante de astrocitos humanos (10 μ l) se evaluaron por HTRF (IL6: 62IL6PEC; IL8: 62IL8PEC; CXCL1: 6FGROPEG, Cisbio, Francia) y el nivel de proteína humana CCL2 (ng/ml) sobrenadantes de astrocitos humanos (5 μ l) se evaluó mediante AlphaLISA de CCL2/MCP1 humana (AL244C, PerkinElmer, EE. UU.). Todas las mediciones se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se obtuvieron suspensiones celulares de astrocitos humanos de cultivos adherentes usando PBS-EDTA 5 mM. Para tinción extracelular, las células se incubaron con IgG de ratón completa durante 10 min a 4 °C en PBS con BSA al 2 %, y después se tiñeron con anticuerpos durante 30 min a 4 °C en PBS con BSA al 2 %. Para tinción intracelular, las células se permeabilizaron con solución de Cytofix/Cytoperm (554714, BD Biosciences, Suiza) durante 20 min a 4 °C antes de incubarlas con anticuerpos 30 min a 4 °C. Después de la filtración a través de tamiz de 70 μ m, las células se adquirieron en un BDFortessa (BD Biosciences, Suiza) y los datos se analizaron usando el programa informático FlowJo (Tree Star Inc., EE. UU.).

Después de tratamiento con el compuesto, las células se lavaron en PBS (Sigma Aldrich, Alemania) seguido de fijación en metano de en metanol de 100% enfriado en hielo durante 10 min. Las células se lavaron 3 x 5 min en PBS estéril, después se permeabilizaron por incubación con Triton-X-100 al 0,2 % (Sigma Aldrich, Alemania) en PBS durante 5 min a temperatura ambiente. Los sitios no reactivos se bloquearon durante una noche a +4 °C con tampón de bloqueo que consistía en suero normal de cabra al 10 % (Life Technology, EE. UU.) y seroalbúmina bovina al 2 % (Sigma Aldrich, Alemania) en PBS. Las células entonces se incubaron en anticuerpo primario durante una noche a 4 °C. El anticuerpo primario se retiró y las células se lavaron 3 x 5 min con PBS, después de ello se aplicó el anticuerpo fluorescente secundario durante 2 h a temperatura ambiente. Los cubreobjetos entonces se lavaron 5 x 5 min en PBS y se contratiñeron con tinte nuclear Hoescht 34580. Los cubreobjetos finalmente se montaron en portaobjetos de microscopio en medio de montaje VectashieldR (Vector, R.U.) y los bordes del cubreobjetos se selló con laca de uñas. Se tomaron imágenes de las células usando un microscopio láser confocal de barrido Zeiss LSM 510 META utilizando un microscopio invertido Axiovert 200M (Zeiss Ltd, Alemania).

Resultados

El antagonismo de la estimulación de TNF- α o IL-17A, o la coestimulación de IL-17A/TNF- α mediante XAB4 se muestra en las figuras 21 A a 25 A. Se muestra un antagonismo de IL-1 β o coestimulación de IL-17A/IL-1 β por XAB4 en las figuras 21 B a 25 B.

La figura 21 muestra efecto antagonista sobre la liberación de IL-6, la figura 22 muestra efecto antagonista sobre la liberación de CXCL1, la figura 23 muestra efecto antagonista sobre IL-8, la figura 24 muestra efecto antagonista sobre GM-CSF y la figura 25 muestra efecto antagonista sobre CCL2.

Astroцитos humanos primarios se trataron con concentraciones crecientes de XAB4 (0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM y 10 nM), con o sin IL-17A (50 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml), IL-1 β , IL-17A/TNF- α y IL-1 β /TNF- α . Todas las concentraciones usadas se indican en las figuras. Los datos mostrados son representativos de dos experimentos para XAB4 0,01 nM, y de tres experimentos para XAB4 0,1 nM, 1 nM y 10 nM. Los valores mostrados son la media \pm E.T.M.

Como se observa en la figura 21A, XAB4 (todas las concentraciones) tiene un efecto antagonista, en comparación con el control y el isotipo, sobre la liberación de IL-6 desde astroцитos estimulados con IL-17A o IL-17A/TNF- α . La concentración de IL-6 (ng/ml) se representa en el eje de ordenadas y la concentración de XAB4 se representan en el eje de abscisas (0, es decir control, 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM y 10 nM) para cada conjunto de datos, y 10 nM para el isotipo. El conjunto de datos a la izquierda se refiere a células no estimuladas, el siguiente conjunto de datos se refiere a células estimuladas con TNF- α (10 ng/ml), el siguiente conjunto de datos se refiere a células estimuladas con IL-17A (50 ng/ml) y el último conjunto de datos se refiere a células coestimuladas con TNF- α (10 ng/ml) e IL-17A (50 ng/ml). El último conjunto de datos es de aproximadamente 10 veces la escala del eje de ordenadas. Como se observa en la figura 21B, XAB4 (todas las concentraciones) no tiene efecto antagonista sobre las células estimuladas con IL-1 β (0,1 ng/ml) o coestimuladas con IL-1 β (0,1 ng/ml) e IL-17A (50 ng/ml), en comparación con el isotipo.

Como se observa en la figura 22A, XAB4 (todas las concentraciones) tiene un efecto antagonista, en comparación con el control y el isotipo, sobre la liberación de CXCL1 desde astroцитos estimulados con IL-17A o IL-17A/TNF- α . La concentración de CXCL1 (ng/ml) se representa en el eje de ordenadas y la concentración de XAB4 se representan en el eje de abscisas (0, es decir control, 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM y 10 nM) para cada conjunto de datos, y 10 nM para el isotipo. El conjunto de datos a la izquierda se refiere a células no estimuladas, el siguiente conjunto de datos se refiere a células estimuladas con TNF- α (10 ng/ml), el siguiente conjunto de datos se refiere a células estimuladas con IL-17A (50 ng/ml) y el último conjunto de datos se refiere a células coestimuladas con TNF- α (10 ng/ml) e IL-17A (50 ng/ml). El último conjunto de datos es de aproximadamente 10 veces la escala del eje de ordenadas. Como se observa en la figura 22B, XAB4 (todas las concentraciones) no tiene efecto antagonista sobre las células estimuladas con IL-1 β (0,1 ng/ml) o coestimuladas con IL-1 β (0,1 ng/ml) e IL-17A (50 ng/ml), en comparación con el isotipo.

Como se observa en la figura 23A, XAB4 (todas las concentraciones) tiene un efecto antagonista, en comparación con el control, sobre la liberación de IL-8 desde astroцитos estimulados con IL-17A o IL-17A/TNF- α . En comparación con el isotipo, XAB4 (0,1 nM, 1 nM y 10 nM) tiene un efecto antagonista sobre la liberación de IL-8. La concentración de IL-8 (ng/ml) se representa en el eje de ordenadas y la concentración de XAB4 se representan en el eje de abscisas (0, es decir control, 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM y 10 nM) para cada conjunto de datos, y 10 nM para el isotipo. El conjunto de datos a la izquierda se refiere a células no estimuladas, el siguiente conjunto de datos se refiere a células estimuladas con TNF- α (10 ng/ml), el siguiente conjunto de datos se refiere a células estimuladas con IL-17A (50 ng/ml) y el último conjunto de datos se refiere a células coestimuladas con TNF- α (10 ng/ml) e IL-17A (50 ng/ml). El último conjunto de datos es de aproximadamente 5 veces la escala del eje de ordenadas. Como se observa en la figura 23B, XAB4 (todas las concentraciones) no tiene efecto antagonista sobre las células estimuladas con IL-1 β (0,1 ng/ml) o coestimuladas con IL-1 β (0,1 ng/ml) e IL-17A (50 ng/ml), en comparación con el isotipo.

Como se observa en la figura 24A, XAB4 (todas las concentraciones) tiene un efecto antagonista, en comparación con el control y el isotipo, sobre la liberación de GM-CSF desde astroцитos estimulados con IL-17A/TNF- α . XAB4

(0,1 nM, 1 nM y 10 nM) tiene un efecto antagonista sobre la liberación de GM-CSF desde astrocitos estimulados con IL-17A, en comparación con el isotipo y el control. La concentración de GM-CSF (ng/ml) se representa en el eje de ordenadas y la concentración de XAB4 se representan en el eje de abscisas (0, es decir control, 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM y 10 nM) para cada conjunto de datos, y 10 nM para el isotipo. El conjunto de datos a la izquierda se refiere a células no estimuladas, el siguiente conjunto de datos se refiere a células estimuladas con TNF- α (10 ng/ml), el siguiente conjunto de datos se refiere a células estimuladas con IL-17A (50 ng/ml) y el último conjunto de datos se refiere a células coestimuladas con TNF- α (10 ng/ml) e IL-17A (50 ng/ml). Como se observa en la figura 24B, XAB4 (todas las concentraciones) tiene ninguno o bajo efecto antagonista sobre las células estimuladas con IL-1 β (0,1 ng/ml) o coestimuladas con IL-1 β (0,1 ng/ml) e IL-17A (50 ng/ml), en comparación con el isotipo.

Como se observa en la figura 25A, XAB4 (todas las concentraciones) tiene un efecto antagonista, en comparación con el control y el isotipo, sobre la liberación de CCL2 desde astrocitos estimulados con IL-17A. XAB4 (0,1 nM, 1 nM y 10 nM) tiene un efecto antagonista sobre la liberación de CCL2 desde astrocitos estimulados con IL-17A/TNF- α , en comparación con el isotipo y el control. La concentración de CCL2 (ng/ml) se representa en el eje de ordenadas y la concentración de XAB4 se representan en el eje de abscisas (0, es decir control, 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM y 10 nM) para cada conjunto de datos, y 10 nM para el isotipo. El conjunto de datos a la izquierda se refiere a células no estimuladas, el siguiente conjunto de datos se refiere a células estimuladas con TNF- α (10 ng/ml), el siguiente conjunto de datos se refiere a células estimuladas con IL-17A (50 ng/ml) y el último conjunto de datos se refiere a células coestimuladas con TNF- α (10 ng/ml) e IL-17A (50 ng/ml). Como se observa en la figura 25B, XAB4 (todas las concentraciones) no tiene efecto antagonista sobre las células estimuladas con IL-1 β (0,1 ng/ml) o coestimuladas con IL-1 β (0,1 ng/ml) e IL-17A (50 ng/ml), en comparación con el isotipo.

Conjuntamente, los datos sugirieron que la inhibición selectiva de la señalización de IL-17A con XAB4 atenúa el nivel de citocinas proinflamatorias en astrocitos humanos. En enfermedad, se sugiere que los astrocitos desempeñan funciones en una serie de trastornos psiquiátricos, neurológicos y neurodegenerativos, donde su función en la neuroinflamación probablemente es importante. Como se demostró que XAB4 tiene un efecto sobre la producción de IL-6, CXCL1, IL-8, GM-CSF y CCL2 de los astrocitos, XAB4 puede ser un agente terapéutico útil, tal como para el tratamiento de esclerosis múltiple (EM).

30 Información de secuencias

Los datos de secuencias que se refieren a XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 se resume a continuación para facilitar la referencia.

35 La tabla 1 describe las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO) de las cadenas pesada y ligera de longitud completa de los ejemplos XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5.

Los anticuerpos XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5 pueden producirse usando producción recombinante convencional de anticuerpos y procesos de purificación. Por ejemplo, las secuencias codificantes que se describen en la tabla 3 o tabla 4 se clonan en un vector de producción para la expresión recombinante en línea celular de producción de mamífero.

45 La tabla 2 resume la secuencia de aminoácidos de cadena pesada (VH) y ligera (VL) variable de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5, que puede usarse para generar anticuerpos quiméricos a partir de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 o XAB5.

La tabla 5 resume las secuencias de CDR útiles de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 (más las secuencias de consenso) para generar anticuerpos alternativos con CDR injertadas, en los que las regiones CDR de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 se definen de acuerdo con la definición de Kabat.

50 La tabla 6 resume las secuencias de CDR útiles de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 (más las secuencias de consenso) para generar anticuerpos alternativos con CDR injertadas, en los que las regiones CDR de XAB1, XAB2, XAB3, XAB4 y XAB5 se definen de acuerdo con la definición de Chotia.

Todas las secuencias mencionadas en esta memoria descriptiva (SEQ ID NO) se encuentran en la tabla 36.

Lista de secuencias

Las secuencias útiles de aminoácidos y nucleótidos para poner en práctica la invención se encuentran en la tabla 36.

60 Tabla 36. Lista de secuencias

Anticuerpo/ fragmento	Identificador de secuencia (SEQ ID NO:)	Secuencia de aminoácidos o secuencia polinucleotídica (PN)
XAB1, CDRH1 (CHOTH1A)	1	GFTFSSY

ES 2 758 473 T3

XAB1, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB1, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB1, CDRL1 (CHOTHIA)	4	SQGIISA
XAB1, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB1, CDRL3 (CHOTHIA)	6	FNSYPL
XAB1, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB1, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKG
XAB1, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB1, CDRL1 (KABAT)	9	RPSQGIISALA
XAB1, CDRL2 (KABAT)	10	DASSLEN
XAB1, CDRL3 (KABAT)	11	QQFNYSYPLT
XAB1, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRSLCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSLYY WGQGLTVTVSS
XAB1, VL	13	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRPSQGIISALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLENGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQFNYSYPLTFGGGTKVEIK
XAB1, CADENA PESADA	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRSLCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSLYY WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB1, CADENA LIGERA	15	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRPSQGIISALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLENGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQFNYSYPLTFGGGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 12	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGCTTCACCTCAGCAGCTACTGGA TGTCCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGCAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCT GGTACCGTGTCCAGC
PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 13	17	

		<p>GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGCCAAGTCAGGGCATTATCAGTGCTTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGC TCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAATGGG GTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCC TGAAGATTTTGAACCTTATTACTGTCAACAGTTTAA TAGTTACCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGACCAAG GTGGAGATCAAA</p>
<p>PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 14</p>	<p>18</p>	<p>GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGCAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCC CAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAG CACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCC AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAG CCACACCTGCCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCT GCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCCTCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGAC GGCAGTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG ACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGTGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGG CAAG</p>
<p>PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 15</p>	<p>19</p>	

ES 2 758 473 T3

		GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGCCAAGTCAGGGCATTATCAGTGCTTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGC TCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAATGGG GTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGATCTGGGA CAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCC TGAAGATTTTGAACCTATTACTGTCAACAGTTTAA TAGTTACCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAG GTGGAGATCAAACGTACGGTGGCCGCTCCCAGC GTGTTTCATCTTCCCCCAGCGAGCAGCAGTGA AGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGA ACAACTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTG GAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAG CCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGA CTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTG AGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACG CCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCC CCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
XAB2, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB2, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB2, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB2, CDRL1 (CHOTHIA)	20	SQVIISA
XAB2, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB2, CDRL3 (CHOTHIA)	21	FDSYPL
XAB2, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB2, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKG
XAB2, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB2, CDRL1 (KABAT)	22	RPSQVIISALA
XAB2, CDRL2 (KABAT)	23	DASSLEQ
XAB2, CDRL3 (KABAT)	24	QQFDSYPLT
XAB2, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRSLCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLLY WGQGLTVTVSS
XAB2, VL	25	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRPSQVIISALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFSGSVSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQFDSYPLTFGGGTKEIK
XAB2, CADENA PESADA	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRSLCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLLY WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB2, CADENA LIGERA	26	

ES 2 758 473 T3

		AIQLTQSPSSLSASVGDVRTITCRPSQVIISALAWYQ QKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFSGSVSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQFDSYPLTFGGGKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 12	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGCAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCT GGTCACCGTGTCCAGC
PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 25	27	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGCCCAGCCAGGTCATCATCAGCGCCCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAC AGGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGTGT CCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCGACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAG
PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 14	18	

		<p>GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGCAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCC CAGCGTGTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAG CACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCC AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCCAAGAGAC CCACACCTGCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCT GCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAAAGA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGG CCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTGTGACAGCGAC GGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG ACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGTGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGG CAAG</p>
<p>PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 26</p>	<p>28</p>	<p>GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCCGCCAGCCAGGTCATCATCAGCGCCCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAC AGGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGTGT CCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGTCCCT GCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCGACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCG CTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGACGA GCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAATTCTACCCCGGGAGGCCAAG GTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGAC AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAA GGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCT GTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGG CGAGTGC</p>

ES 2 758 473 T3

<p>PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 12</p>	<p>29</p>	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTACCTTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTG ACAGTGTCTTCT</p>
<p>PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 25</p>	<p>30</p>	<p>GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGTCAGGTGATCATTAGCGCCCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAACAGG GCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGTGTCAAG CACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAAGCAGT TCGATAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGGAAATCAAG</p>
<p>PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 14</p>	<p>31</p>	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTACCTTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTG ACAGTGTCTTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTG TCTTTCCCTGGCCCCAGCAGCAAGTCCACAAG CGGAGGCACTGCAGCTCTGGGTTGTCTGGTGAA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGG AACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACC TTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTAC AGCCTGAGCAGCGTCGTGACTGTGCCTAGTTCCA GCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC TGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGA GGACCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCACAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGG TGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGG ACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG GGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAG AGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GTCCGTCTGACAGTGTGACACCAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACA</p>

		AGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAG CAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACACTACAAG ACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGC TTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTACGCTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 26	32	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGTCAGGTGATCATTAGCGCCCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAACAGG GCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGTGTCAGG CACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTGACAGT TCGATAGCTACCCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGAAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCC AGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGC TGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGC TGAACAACCTTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAA GGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGT ACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
XAB3, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB3, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB3, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB3, CDRL1 (CHOTHIA)	33	SQGIYWE
XAB3, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB3, CDRL3 (CHOTHIA)	6	FNSYPL
XAB3, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB3, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKG
XAB3, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB3, CDRL1 (KABAT)	34	RPSQGIYWELA
XAB3, CDRL2 (KABAT)	23	DASSLEQ
XAB3, CDRL3 (KABAT)	11	QQFNSYPLT
XAB3, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSLYY WGQGLTVTVSS
XAB3, VL	35	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRPSQGIYWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFSGSGSDFT LTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK
XAB3, CADENA PESADA	14	

		EVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLLY WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB3, CADENA LIGERA	36	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRPSQGIYWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFSGSGSDFT LTISSLQPEDFATYYCQQFNYSYPLTFGGGKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 12	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGCCTGGGTCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGCAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCT GGTCACCGTGTCCAGC
PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 35	37	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGCCCAGCCAGGGCATCTACTGGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAC AGGGCGTGGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGAT CCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCAACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAG
PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 14	18	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGCCTGGGTCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC

		<p>GGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAACAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCCCT GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCC CAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAG CACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCC AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCT GCTGGGCGGACCCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCCTCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTGTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCTGGG ACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACCCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGG CAAG</p>
<p>PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 36</p>	<p>38</p>	<p>GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGCCCAGCCAGGGCATCTACTGGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCC AAGCTGTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAC AGGGCGTGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGAT CCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCAACAGCTACCCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCG CTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGA GCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAATTCTACCCCCGGGAGGCCAAG GTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGAC AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAA GGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCT GTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGG CGAGTGC</p>
<p>PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 12</p>	<p>29</p>	

ES 2 758 473 T3

		<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTCACCTTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACAGTGTCTTCT</p>
<p>PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 35</p>	<p>39</p>	<p>GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGCCAGGGAATCTACTGGGAGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAACAGG GCGTGCCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTGACGAGT TTAACTCCTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGGAAATCAAG</p>
<p>PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 14</p>	<p>31</p>	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTCACCTTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACAGTGTCTTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTG TCTTTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCCACAAG CGGAGGCACTGCAGCTCTGGGTTGTCTGGTGAA GGACTIONTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTCTGG AACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCT TTCCCCGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTAC AGCCTGAGCAGCGTCGTGACTGTGCCTAGTTCCA GCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC TGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGA GGACCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCCCAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGG TGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGG ACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG GGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAG AGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GTCCGTCCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAG CAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGG</p>

		GAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAG ACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGC TTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCCAGCTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 36	40	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTACTATCACCTG TAGACCTAGCCAGGGGAATCTACTGGGAGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAACAGG GCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TTAACTCCTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCC AGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGC TGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGC TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAA GGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGT ACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
XAB4, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB4, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB4, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB4, CDRL1 (CHOTHIA)	41	SQGINWE
XAB4, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB4, CDRL3 (CHOTHIA)	6	FNSYPL
XAB4, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB4, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKG
XAB4, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB4, CDRL1 (KABAT)	42	RPSQGINWELA
XAB4, CDRL2 (KABAT)	23	DASSLEQ
XAB4, CDRL3 (KABAT)	11	QQFNSYPLT
XAB4, VH	12	EVQLVESGGDLVQPGGSLRSLCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSLYY WGQGLTVTVSS
XAB4, VL	43	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRPSQGINWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFSGSGGTDFDFT LTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGKVEIK
XAB4, CADENA PESADA	14	

		EVQLVESGGDLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLLY WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB4, CADENA LIGERA	44	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRPSQGINWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLEQGVPSRFGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQFNSTYPLTFGGGKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 12	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCCCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGCAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCT GGTCACCGTGTCCAGC
PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 43	45	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGCCCAGCCAGGGCATCAACTGGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAC AGGGCGTGGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCTGGAT CCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCAACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAG
PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 14	18	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCCCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGCAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCT GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCC CAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAG

		<p>CACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCCTGACCGT GTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCC AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGCCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCT GCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCCCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCCTCCCGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTGTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG ACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGTATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGG CAAG</p>
<p>PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 44</p>	<p>46</p>	<p>GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGCCCAGCCAGGGCATCAACTGGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAC AGGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGAT CCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCAACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACGGTGGCCG CTCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCAGCA GCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAATTCTACCCCGGGAGGCCAAG GTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGAC AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAA GGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCT GTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGG CGAGTGC</p>
<p>PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 12</p>	<p>29</p>	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTACCTTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG</p>

		GTTCACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTG ACAGTGTCTTCT
PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 43	47	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGTCAGGGGATTAAGTGGGAGCTGGCC TGGATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAACAGG GCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TTAACTCCTACCCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGGAAATCAAG
PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 14	31	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTCACCTTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTG ACAGTGTCTTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTG TCTTTCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCCACAAG CGGAGGCACTGCAGCTCTGGGTTGTCTGGAA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTG AACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCC TTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTAC AGCCTGAGCAGCGTCGTGACTGTGCCTAGTTCCA GCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC TGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGA GGACCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCCCCAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGG TGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGG ACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG GGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAG AGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GTCCGTCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAG CAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGTTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACACTACAAG ACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGC TTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 44	48	

		GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGTCAGGGGATTAAGTGGGAGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAACAGG GCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCAGGACTTCGCTACCTACTACTGTGCAGCAGT TTAACTCCTACCCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGAAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCC AGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGC TGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGC TGAACAATTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAA GGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGT ACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
SEGUNDO PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 12	49	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGCG CCGCTCCGGCTTACCTTCTCCAGCTACTGGAT GTCCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGACT GGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCTC CGAGAAGTACTACGTGGACTCCGTGAAGGGCCG GTTACCATCTCCCGGGACAACGCCAAGAACTCC CTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCCGG GGCTCCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCCCTG GTGACAGTGCCTCC
SEGUNDO PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 43	50	GCCATCCAGCTGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGT CTGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTG TCGGCCCTCCCAGGGCATCAACTGGGAAGTGGC CTGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCCCAA GCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAACAG GGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCG GCACCGACTTACCCTGACCATCTCCAGCCTGCA GCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAG TTCAACTCCTACCCCCTGACCTTCGGCGGAGGCA CCAAGGTGGAATCAAG
SEGUNDO PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 14	51	GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTTGCG CCGCTCCGGCTTACCTTCTCCAGCTACTGGAT GTCCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGACT GGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCTC CGAGAAGTACTACGTGGACTCCGTGAAGGGCCG GTTACCATCTCCCGGGACAACGCCAAGAACTCC CTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAG GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCCGG GGCTCCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCCCTG GTGACAGTGCCTCCGCTCCACCAAGGGCCCAA GCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCA CCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGG TGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCCGTGACCGTGC

		<p>CTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCA CACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCT GTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCAG CAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAAC GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCC ACACCTGCCCCCCTGCCAGCCCCCGAGCTGC TGGGCGGACCCAGCGTGTTCCCTGTTCCCCCCAA GCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCTCC GAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTGTCCCAC GAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGC CCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGT GGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAAGGTGTCC ACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACCA TCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAAGAGAGCCCC AGGTGTACACCCTGCCACCCAGCAGGGAGGAGA TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGT GAAGGGCTTCTACCCAAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAATA CAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGG CAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGAC AAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCT GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA CACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCAGGCCAA G</p>
<p>SEGUNDO PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 44</p>	52	<p>GCCATCCAGCTGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGT CTGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTG TCGGCCCTCCCAGGGCATCAACTGGGAAGTGGC CTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAA GCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAACAG GGCGTGCCCTCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCCG GCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGCA GCCCAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAG TTCAACTCCTACCCCCTGACCTTCGGCGGAGGCA CCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTC CCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCAAGCGACGACGA GCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCT GCTGAACAACCTTCTACCCCAGGGAGGCCAAGGTG CAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAGAGCGTCAACGAGCAGGACAGC AAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGA CCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGG TGACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTG CAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC</p>
XAB5, CDRH1 (CHOTHIA)	1	GFTFSSY
XAB5, CDRH2 (CHOTHIA)	2	KQDGSE
XAB5, CDRH3 (CHOTHIA)	3	DRGSLYY
XAB5, CDRL1 (CHOTHIA)	41	SQGINWE
XAB5, CDRL2 (CHOTHIA)	5	DAS
XAB5, CDRL3 (CHOTHIA)	6	FNSYPL
XAB5, CDRH1 (KABAT)	7	SYWMS
XAB5, CDRH2 (KABAT)	8	NIKQDGSEKYYVDSVKG
XAB5, CDRH3 (KABAT)	3	DRGSLYY
XAB5, CDRL1 (KABAT)	42	RPSQGINWELA
XAB5, CDRL2 (KABAT)	10	DASSLEN
XAB5, CDRL3 (KABAT)	11	QQFNSYPLT
XAB5, VH	12	

		EVQLVESGGDLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLEY WGQGLTVTVSS
XAB5, VL	53	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRPSQGINWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLENGVPSRFSGSGSDFT LTISSLQPEDFATYYCQQFNISYPLTFGGGKVEIK
XAB5, CADENA PESADA	14	EVQLVESGGDLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSSYWMS WVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGSLEY WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
XAB5, CADENA LIGERA	54	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRPSQGINWELAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLENGVPSRFSGSGSDFT LTISSLQPEDFATYYCQQFNISYPLTFGGGKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVWCLLNFPYREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 12	16	GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGCAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGCACCT GGTACCGTGTCCAGC
PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 53	55	GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCGGCCCAGCCAGGGCATCAACTGGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAA ACGGCGTGCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCCGAT CCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCAACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAG
PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 14	18	

		<p>GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCAGCCTG GTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGC GCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACTGGA TGTCTGGGTCCGCCAGGCCCTGGCAAAGGCC TCGAATGGGTGGCCAACATCAAGCAGGACGGCA GCGAGAAGTACTACGTGGACAGCGTGAAGGGCC GGTTACCATCAGCCGGGACAACGCCAAGAAGAG CCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGA GGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACCG GGGCAGCCTGTACTATTGGGGCCAGGGACCCT GGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGCCCC CAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAG CACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCT GGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCC AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGCAAGAG CCACACCTGCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGACT GCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTTCCCCCCC AAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCC CCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAG GGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGC CCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAA CTACAAGACCACCCCCCAGTGTGGACAGCGAC GGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG ACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGTATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGG CAAG</p>
<p>PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 54</p>	<p>56</p>	<p>GCCATCCAGCTGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTG AGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACC TGTCCGCCAGCCAGGGCATCAACTGGGAGCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCC AAGCTGCTGATCTACGACGCCAGCTCCCTGGAAA</p>

		<p>ACGGCGTGCCCAGCCGGTTCAGCGGCAGCGGAT CCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCT GCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG CAGTTCAACAGCTACCCCTGACCTTCGGCGGAG GCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCG CTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGA GCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTG CCTGCTGAACAATTCTACCCCGGGAGGCCAAG GTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGC GGCAACAGCCAGGAGAGCGTCAACCGAGCAGGAC AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAA GGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCT GTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGG CGAGTGC</p>
<p>PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 12</p>	<p>29</p>	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTACCTTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACAGTGTCTTCT</p>
<p>PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 53</p>	<p>57</p>	<p>GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGCTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGTCAGGGGATTAAGTGGGAGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAAAACG GCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCGACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTGCAG CCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TTAACTCCTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGGAAATCAAG</p>
<p>PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 14</p>	<p>31</p>	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGAGGCGACCTG GTGCAGCCTGGCGGCTCACTGAGACTGAGCTGC GCCGCTAGTGGCTTACCTTTAGTAGCTACTGGA TGAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGAC TGGAGTGGGTGGCCAATATTAAGCAGGACGGCTC AGAGAAGTACTACGTGGACTCAGTGAAGGGCCG GTTCACTATTAGCCGGGATAACGCTAAGAATAGC CTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAGAGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGATAGAGG CTCACTGTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTG ACAGTGTCTTCTGCTAGCACCAAGGGCCCAAGTG TCTTTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCCACAAG CGGAGGCACTGCAGCTCTGGGTTGTCTGGTGAA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTCTGG AACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACC TTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTAC AGCCTGAGCAGCGTCGTGACTGTGCCTAGTTCCA GCCTGGGCACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA</p>

		GTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACC TGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGA GGACCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCACAAGCCCA AGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGG TGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGG ACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG GGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAG AGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGT GTCCGTCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAATAACAAGTGCAAAGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAG CAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGT GTACACCCTGCCCCCCAGCCGGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAG GGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAATACTACAAG ACCACCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGC TTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCACTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 54	58	GCTATTCAGCTGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGA GCGTAGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTG TAGACCTAGTCAGGGGATTAAGTGGGAGCTGGCC TGGTATCAGCAGAAGCCCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTACGACGCTAGTAGTCTGGAAAACG GCGTGCCCTTAGGTTTAGCGGCTCAGGCTCAGG CACCAGCTTACCCTGACTATTAGTACCTGCAG CCCAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGT TTAACTCCTACCCCTGACCTTCGGCGGAGGCAC TAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCC AGCGTGTTTATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGC TGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGC TGAACAATTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCA GTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAA CAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAA GGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACC CTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGT ACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGT GC
SECUENCIA LÍDER DE LA CADENA PESADA	59	MEFGLSWVFLVAILEGVHC
SECUENCIA LÍDER DE LA CADENA LIGERA	60	MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARC
PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 59	61	ATGGAATTCGGCCTGAGCTGGGTGTTCTGGTCCG CGATTCTGGAAGGCGTGCACTGC
PN QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 60	62	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGG CTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGCGCCAGATGT
SECUENCIA LÍDER ALTERNATIVA DE LA CADENA PESADA	63	MAWVWTLPLMAAAQSVQA
SECUENCIA LÍDER ALTERNATIVA DE LA CADENA LIGERA	64	MSVLTQVLALLLWLTGTRC

ES 2 758 473 T3

PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 63	65	ATGGCCTGGGTGTGGACCCTGCCCTTCCTGATGG CCGCTGCTCAGTCAGTGCAGGCC
PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 64	66	ATGAGCGTGCTGACTCAGGTGCTGGCCCTGCTGC TGCTGTGGCTGACCGGCACCCGCTGC
SEGUNDA SECUENCIA LÍDER ALTERNATIVA DE LA CADENA PESADA	67	MEWSWVFLFLLSVTTGVHS
SEGUNDA SECUENCIA LÍDER ALTERNATIVA DE LA CADENA LIGERA	68	MSVPTQVLGLLLLWLTDARC
SEGUNDO PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 67	69	ATGGAATGGTCCTGGGTGTTCTGTTCTTCCTGTC CTGACCACAGGCGTGCACTCC
SEGUNDO PN ALTERNATIVO QUE CODIFICA LA SEQ ID NO: 68	70	ATGTCCGTGCCACACAGGTGCTGGGCCTGCTG CTGCTGTGGCTGACCGACGCCAGATGC
CONSENSO, (CHOTHIA) CDRL1	71	SQX ₁ IX ₂ X ₃ X ₄
CONSENSO, (CHOTHIA) CDRL3	72	FX ₁ SYPL
CONSENSO, (KABAT) CDRL1	73	RPSQX ₁ IX ₂ X ₃ X ₄ LA
CONSENSO, (KABAT) CDRL2	74	DASSLEX ₁
CONSENSO, (KABAT) CDRL3	75	QQFX ₁ SYPLT
hulL-17A	76	GITIPRNPGPCPNSDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTN PKRSSDYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKC RHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCP NSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVAEFRH
hulL-17F	77	MRKIPKVGHTFFQKPESCPPVPGGSMKLDIGIINEN QRVMSRNIESRSTSPWNYTVTWDPNRYPSEVVQ AQCRNLGCINAQGGKEDISMNSVPIQQETLVVRRKHQ GCSVSFQLEKVLVTVGCTCVTPIVHHVQ
hulL-17A alternativo	78	GPIVKAGITIPRNPGPCPNSDKNFPRTVMVNLNIHNR NTNTNPKRSSDYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVI WEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRRE PPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA
macIL-17A	79	GIAIPRNSGCPNSDKNFPRTVMVNLNIHNRNTSTN PKRSSDYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKC RHLGCVKADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPRHC PNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA
macIL-17F	80	MRKIPKVGHTFFQKPESCPPVPEGSMKLDIGIINEN QRVMSRNIESRSTSPWNYTVTWDPNRYPSEVVQ AQCKHLGCINAQGGKEDISMNSVPIQQETLVLRKHQ GCSVSFQLEKVLVTVGCTCVTPVHHVQ

ES 2 758 473 T3

rhesusIL-17A	81	GIAIPRNSGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTSTS PKRSSDYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKC RHLGCVKADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPRHC PNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA
IL-17A de tití	82	SPQNPQGPNAEDKNFPRTVMVNLNIRNRNTNSKRA SDYYNRSSSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLG CVDADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPRHCTNSF RLEKMLVSVGCTCVTPIVHHVA
mIL-17A	83	MAAIIPQSSACPNTAEKDFLQNVKVNKVFNSLGAK VSSRRPSDYLNIRSTSPWTLHRNEDPDRYPSVIWEA QCRHQRCVNAEGKLDHHMNSVLIQQEILVLRKREPES CPFTFRVEKMLVGVGCTCVASIVRQAA
mIL-17F	84	APEPEFRHRKNPKAGVPALQKAGNCPPLEDNTVRV DIRIFNQNGISVPREFQNRSSSPWDYNITRDPHRF PSEIAEAQCRHSGCINAQGQEDSTMNSVAIQEILV LRREPQGCNSFRLEKMLLVGCTCVKPIVHQAA
IL-17A de rata	85	MAVLIPQSSVCPNAEANNFLQNVKVNKVINSLSSK ASSRRPSDYLNIRSTSPWTLNRNEDPDRYPSVIWEA QCRHQRCVNAEGKLDHHMNSVLIQQEILVLRKREPEK CPFTFRVEKMLVGVGCTCVSSIVRHAS
huIL-17RA	86	NCTVKNSTCLDDSWIHPRNLTPSSPKDLQIQLHFAH TQQGDLFPVAHIEWTLQTDASILYLEGAELSVLQLNT NERLCVRFEFLSKLRHHHRRWRFTFSHFVVDPDQE YEVTVHHLPKPIPDGDPNHQSKNFLVPDCEHARMK VTTPCMSSGSLWDPNITVETLEAHQLRVSFTLWNES THYQILLTSFPHMENHSCFEHMHIPAPRPEEFHQR SNVTLTLRNLKGCCRHQVQIQPFSSCLNDCLRHSA TVSCPEMPDTPEPIPDYMPPLWEFRHDSGGGLNDIF EAQKIEWHE

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo humano terapéutico aislado o parte de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de cadena pesada (V_H) de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 y una región variable de cadena ligera (V_L) de acuerdo con la SEQ ID NO: 43, y en el que dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo se une específicamente a IL-17A homodimérica y IL-17AF heterodimérica, pero no se une específicamente a IL-17F homodimérica.
- 10 2. Un anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la IL-17A, IL-17AF o IL-17F se selecciona de una o más de macaco cangrejero, macaco de la India, tití, rata, ratón o ser humano.
- 15 3. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de acuerdo con la SEQ ID NO: 14 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de acuerdo con la SEQ ID NO: 44.
- 20 4. Un anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que puede inhibir la secreción de IL-6, o la secreción de GRO-alfa, cuando se evalúa *in vitro*, preferiblemente usando condrocitos o fibroblastos cultivados.
- 25 5. Un anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que puede inhibir la inflamación de rodilla en un modelo experimental de reumatismo articular inducido por antígeno *in vivo*.
- 30 6. Un anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que se conjuga con un resto activo adicional.
- 35 7. Un anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un anticuerpo monoclonal o una parte de unión a antígeno del mismo.
- 40 8. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en combinación con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 45 9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además uno o más principios activos adicionales.
- 50 10. Un anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso como un medicamento.
- 55 11. Un anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento de un trastorno o afección inflamatoria.
- 60 12. Un anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el trastorno o afección es reumatismo articular, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, lupus eritematoso diseminado (LED), nefritis lúpica, asma, esclerosis múltiple o fibrosis quística.
13. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica uno cualquiera de los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
14. Un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el vector es adecuado para la producción recombinante de anticuerpo aislado o partes de unión a antígeno del mismo como se define por una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
15. Una célula hospedadora que comprende uno o más vectores de clonación o expresión de acuerdo con la reivindicación 14.
16. Una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la molécula de ácido nucleico es ARN mensajero (ARNm).
17. Un proceso para la producción de un anticuerpo aislado o parte de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 15, purificar y recuperar dicho anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo.

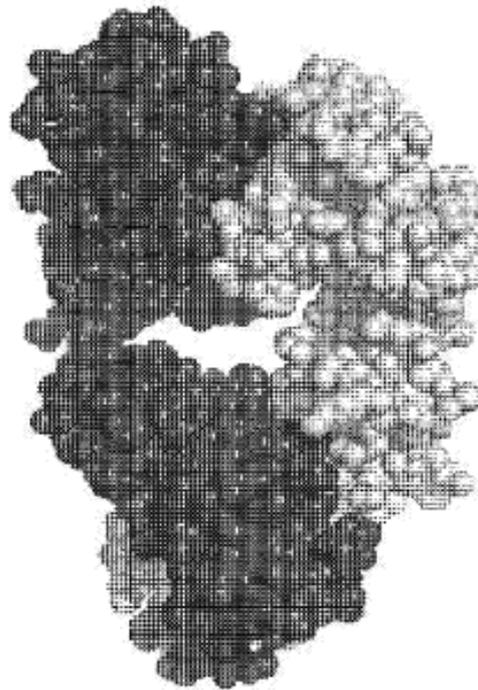


Fig. 1A

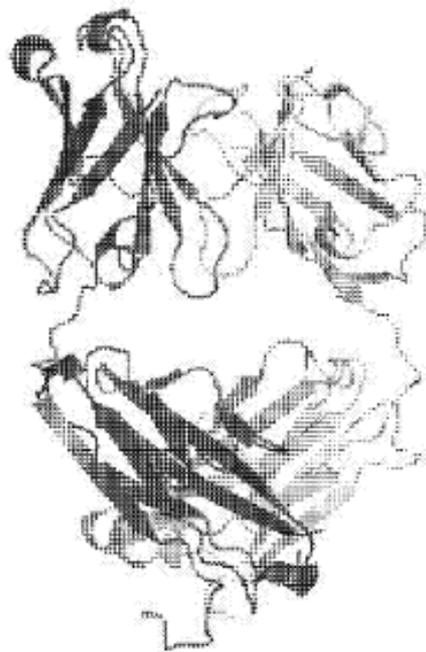


Fig. 1B

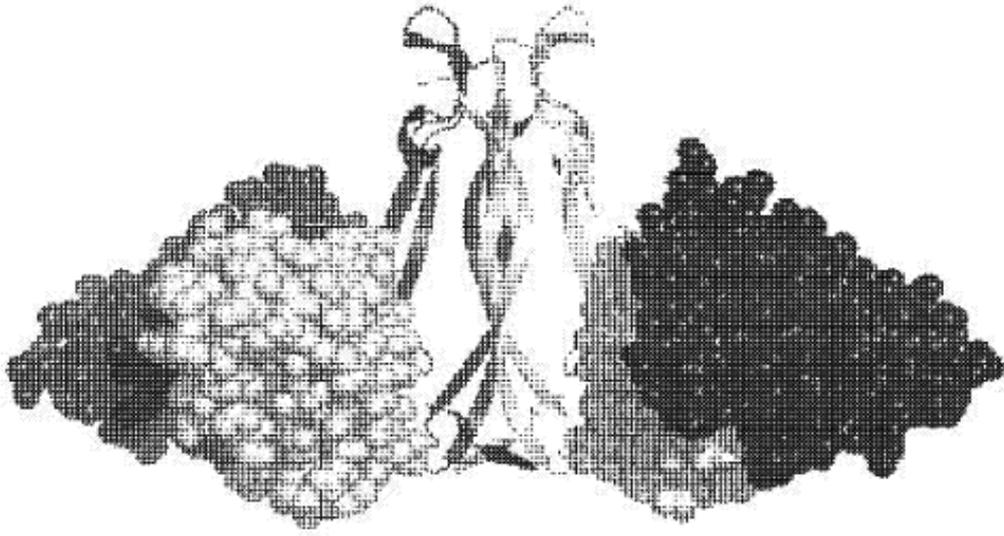


Fig. 2A

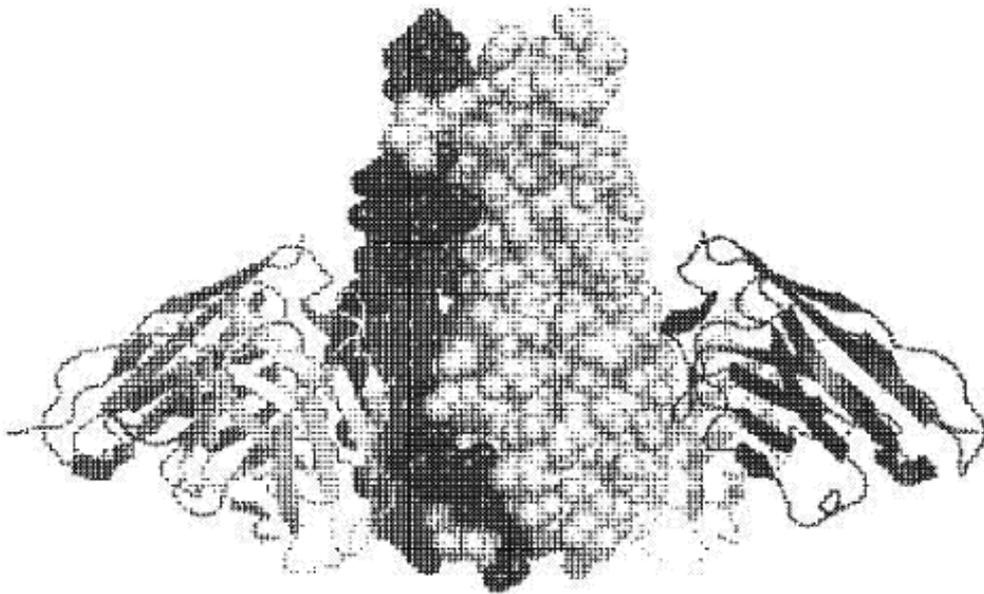


Fig. 2B

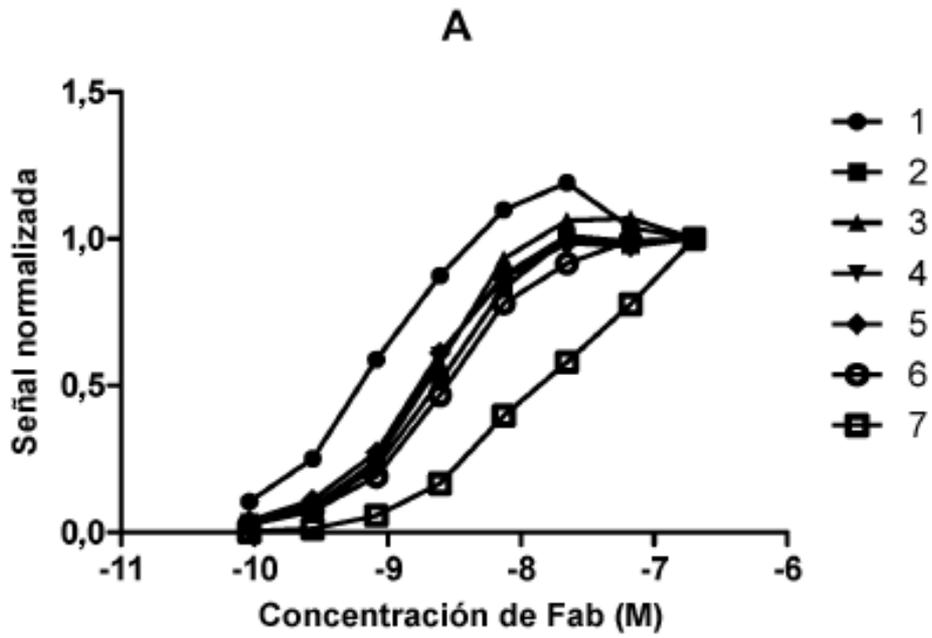


Fig. 3A

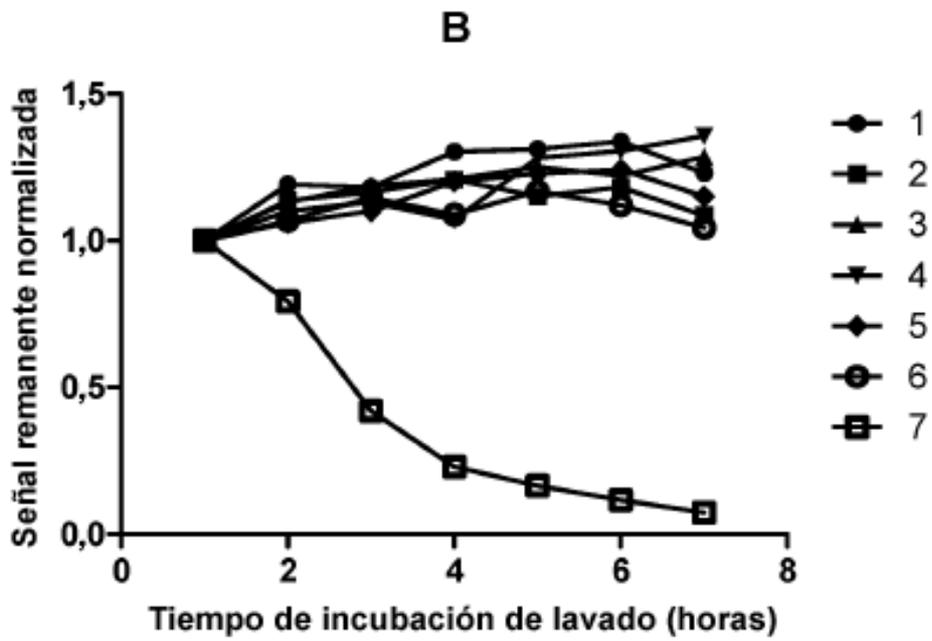


Fig. 3B

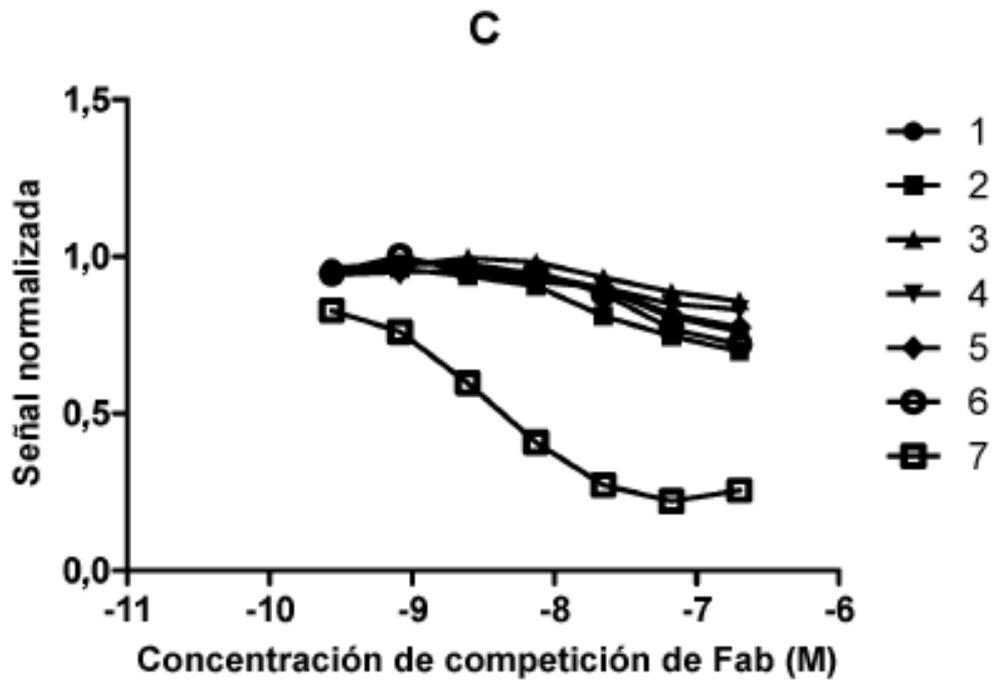


Fig. 3C

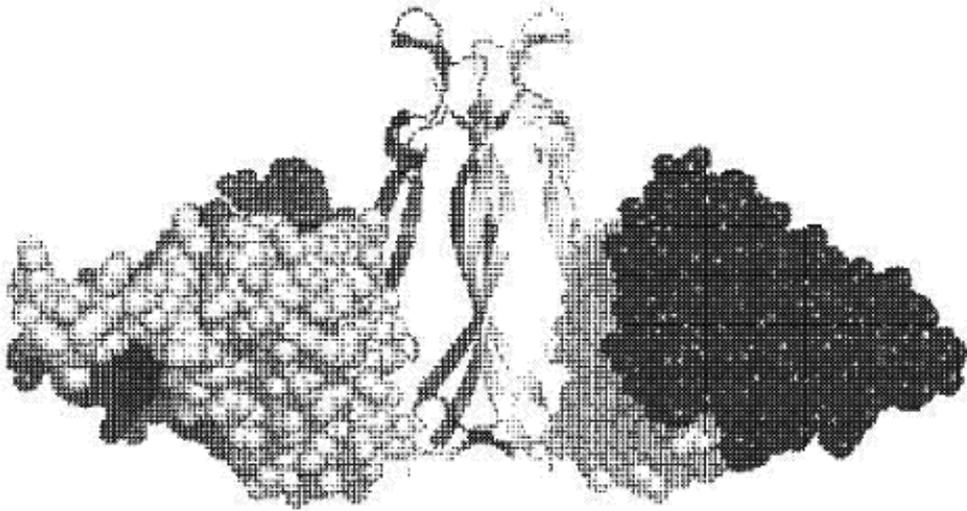


Fig. 4A

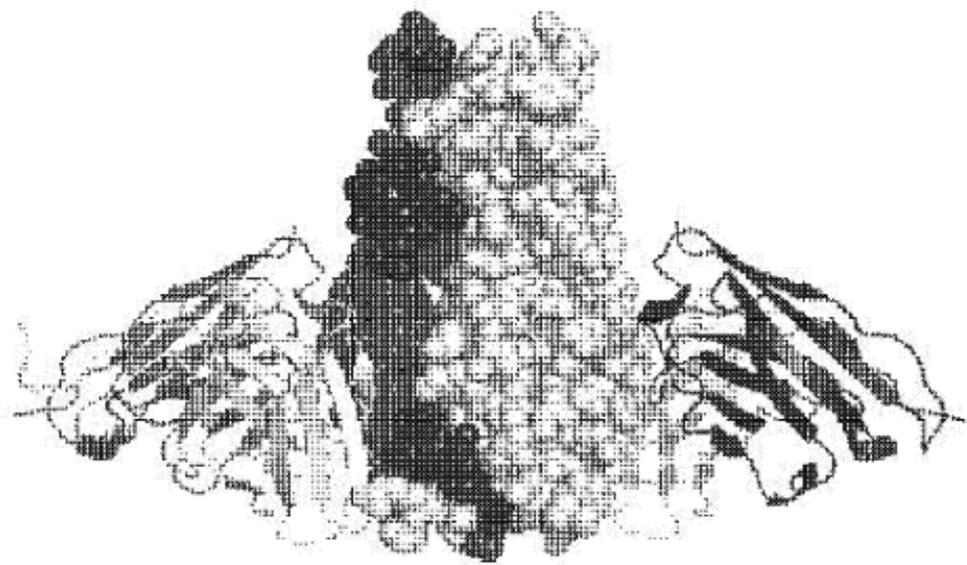


Fig. 4B

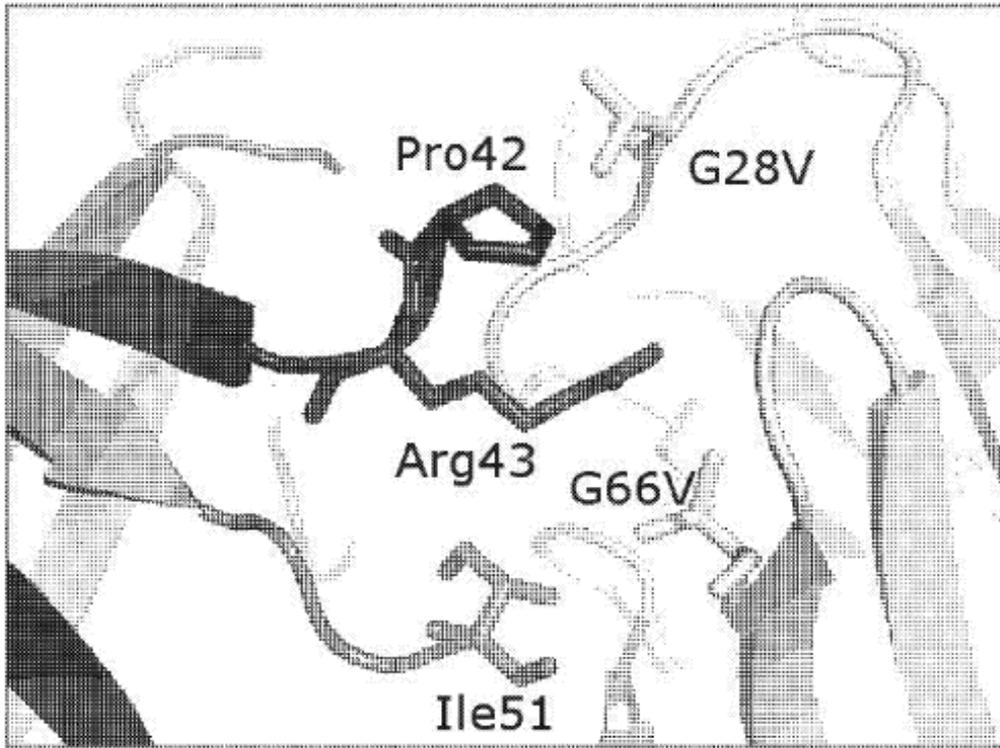


Fig. 5

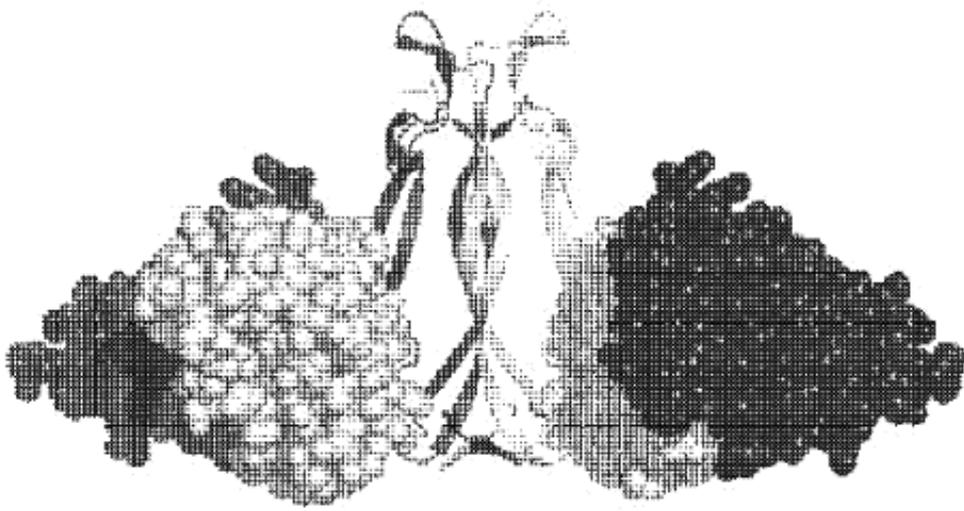


Fig. 6A

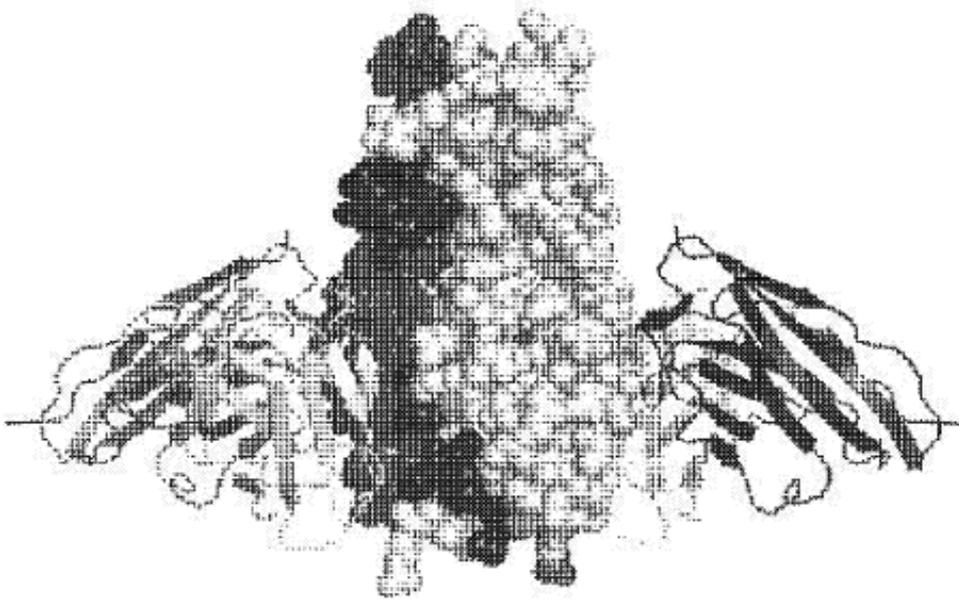


Fig. 6B

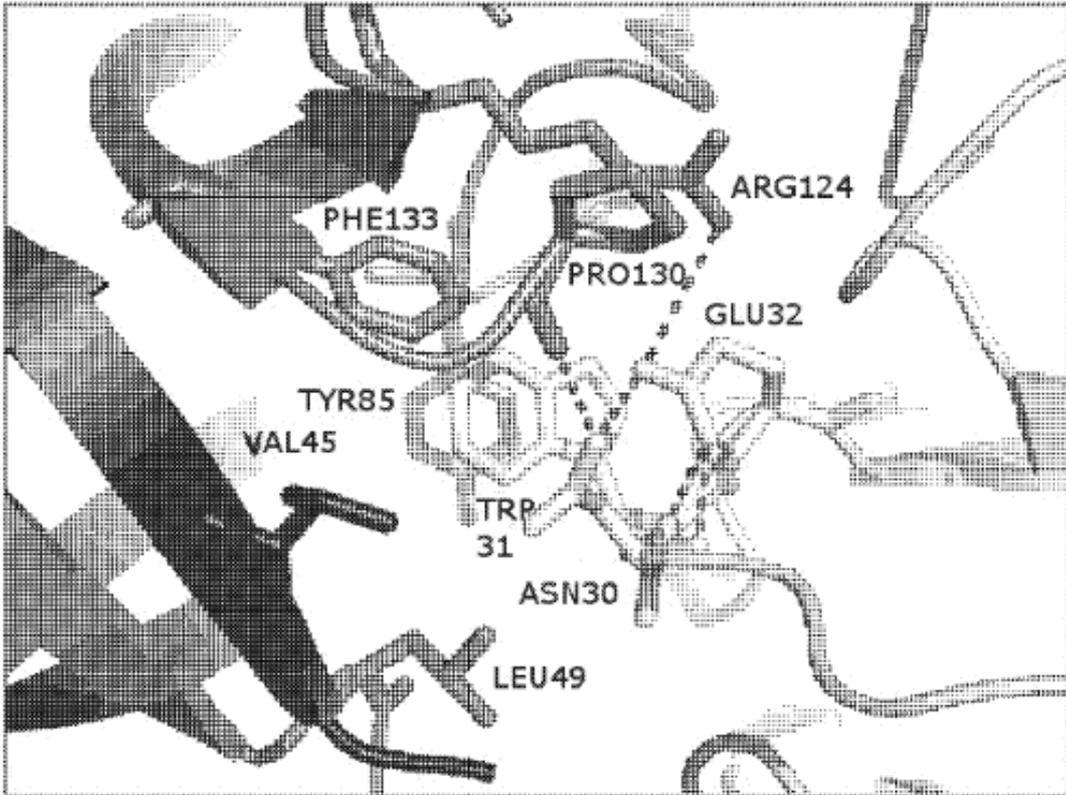


Fig. 7

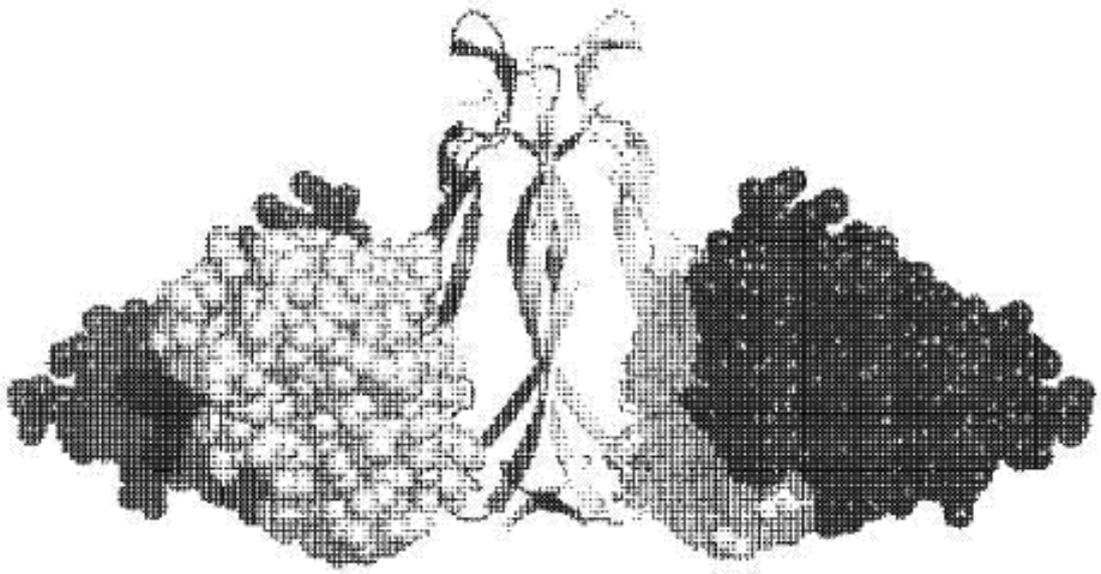


Fig. 8A

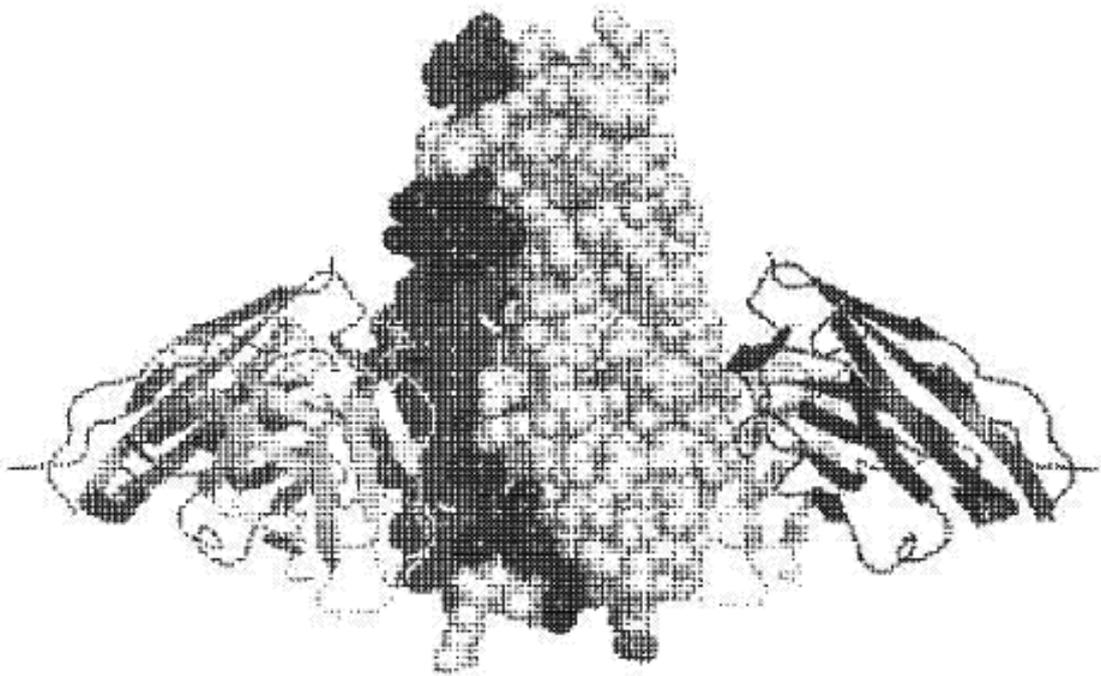


Fig. 8B

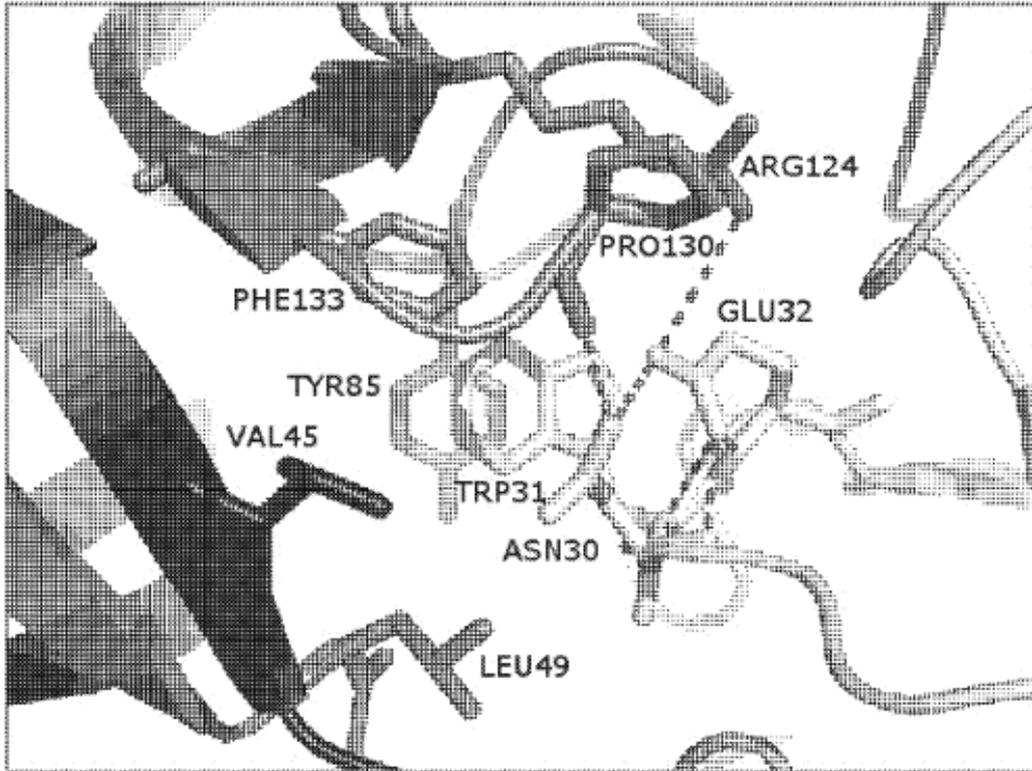


Fig. 9

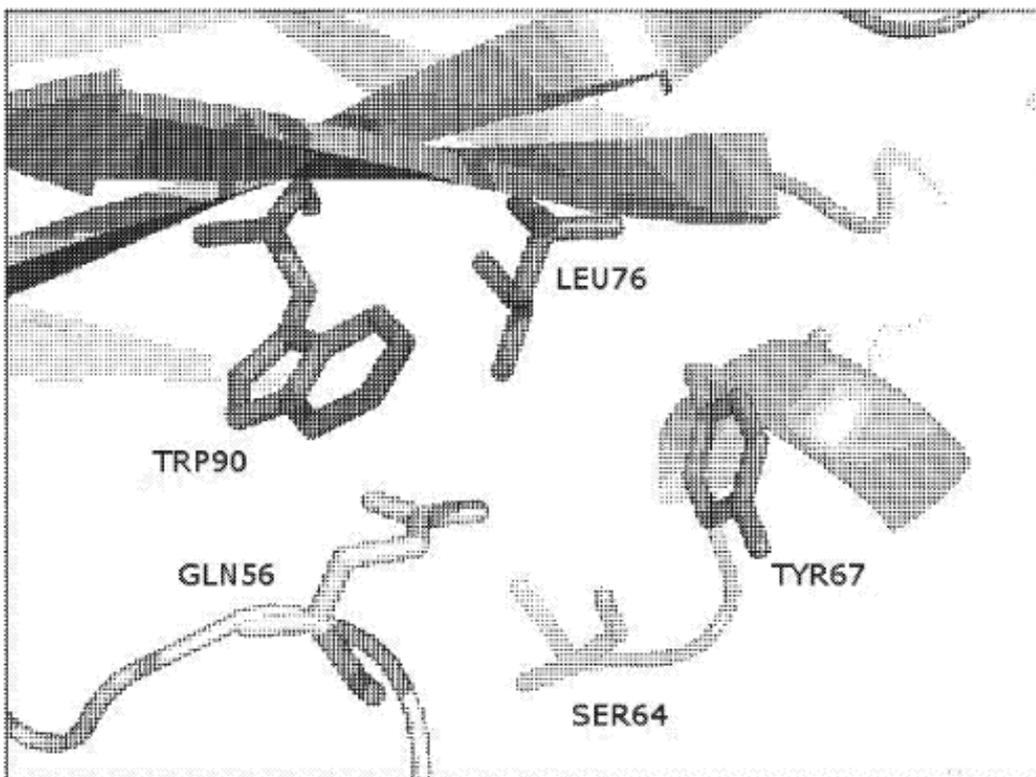


Fig. 10

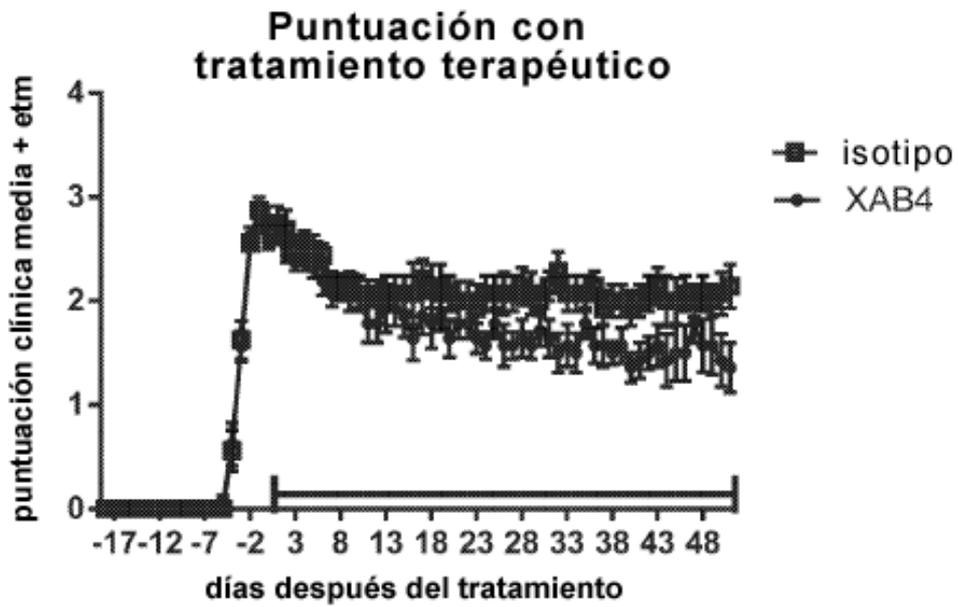


Fig. 11

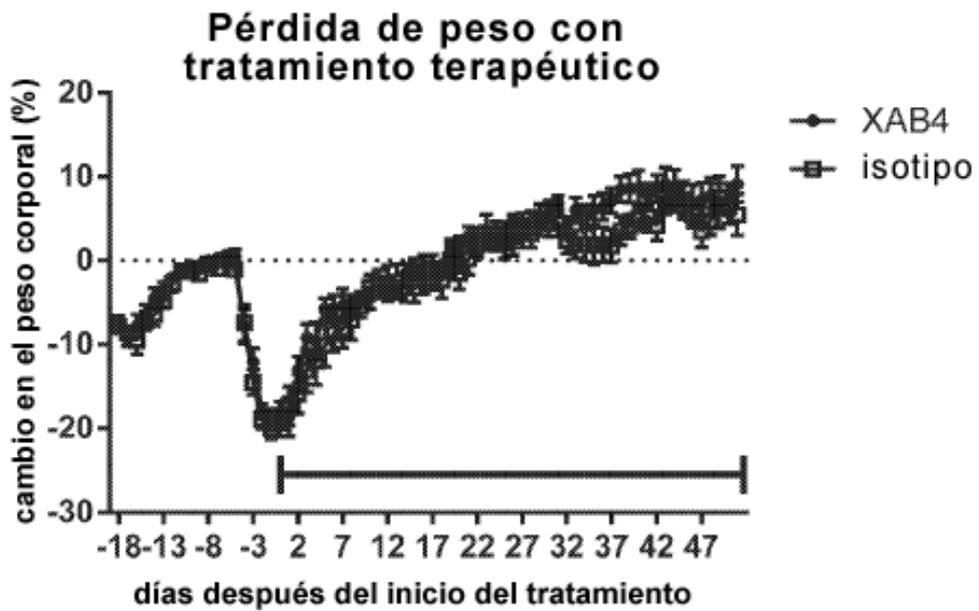


Fig. 12

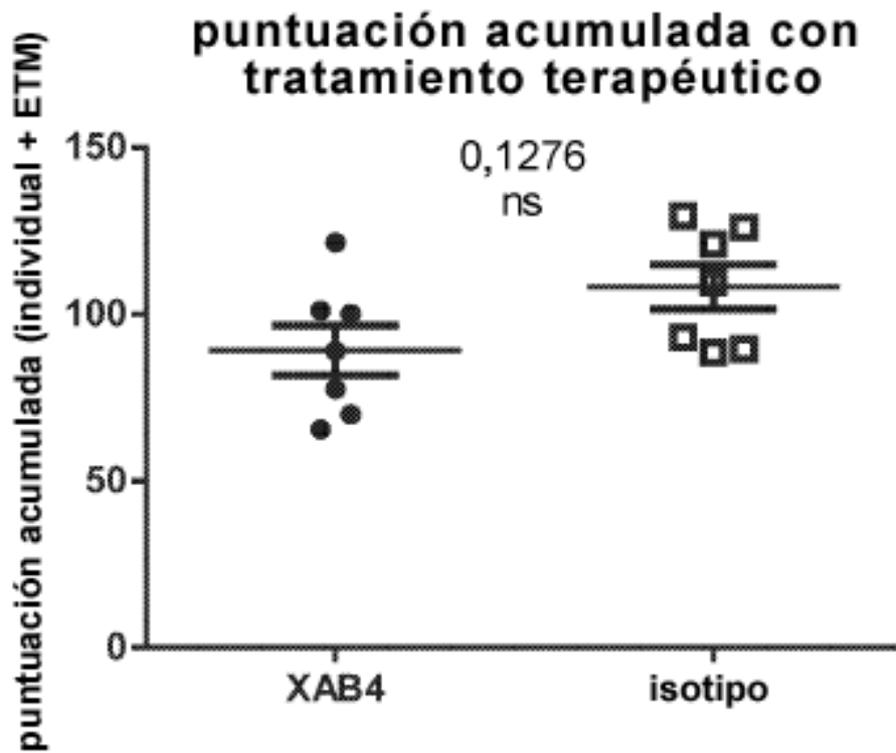


Fig. 13

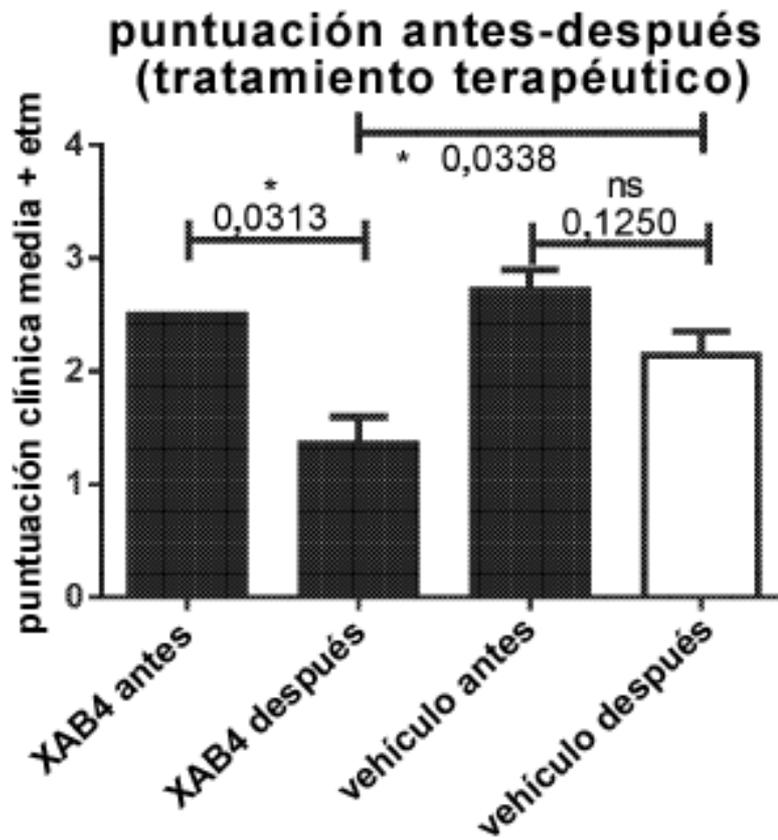


Fig. 14

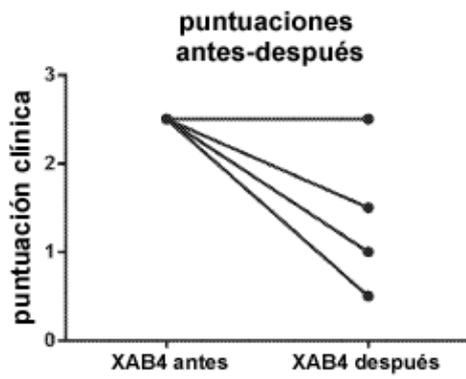


Fig. 15A

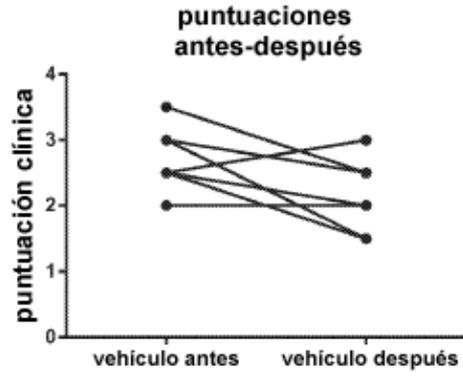


Fig. 15B

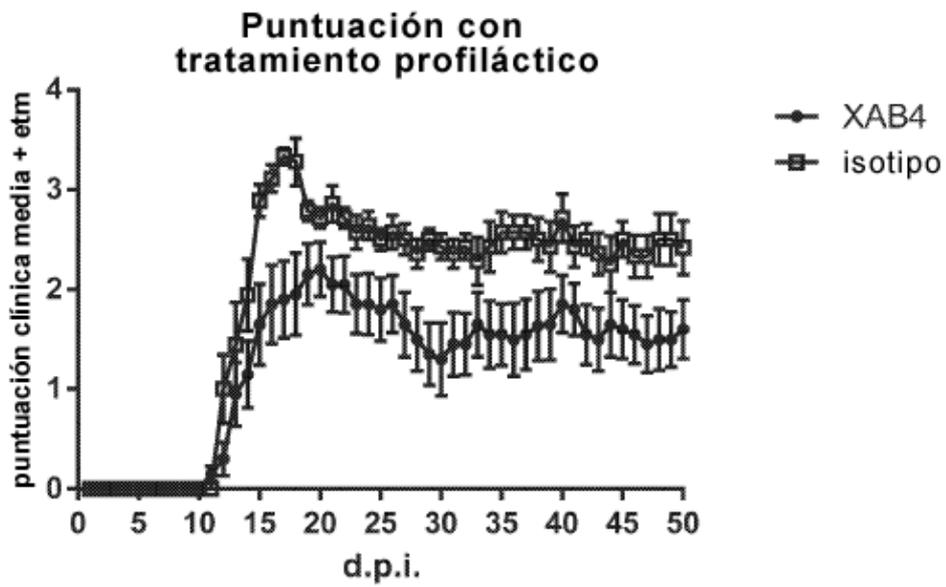


Fig. 16

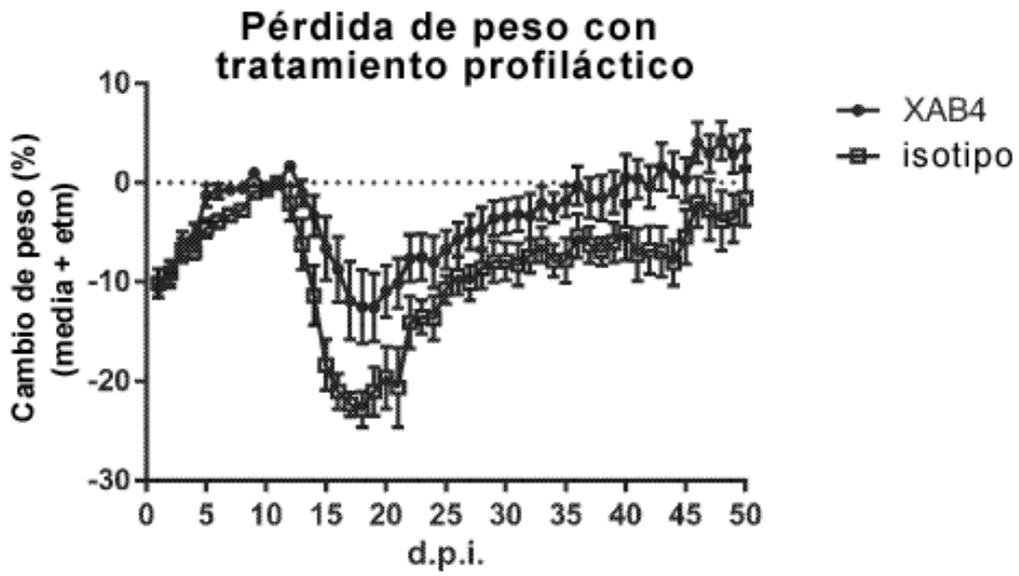


Fig. 17

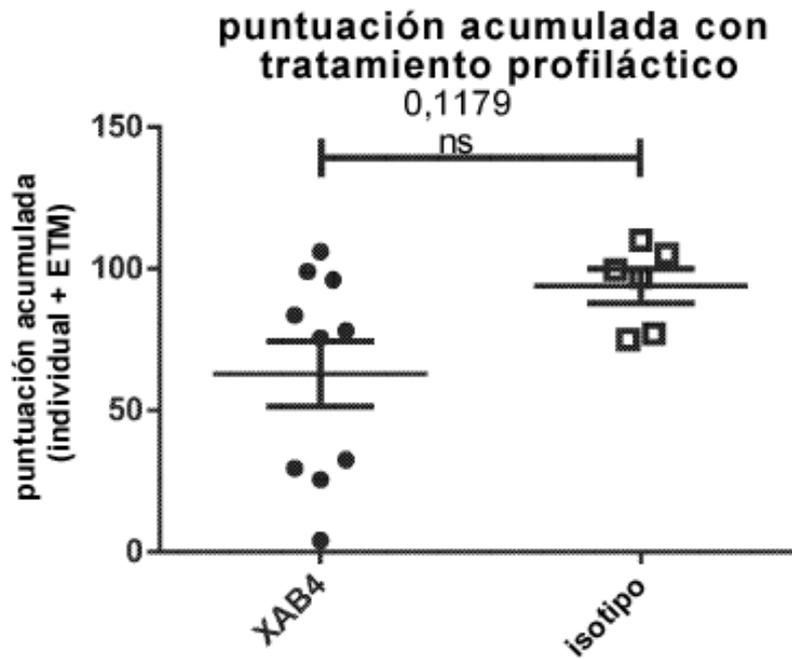


Fig. 18

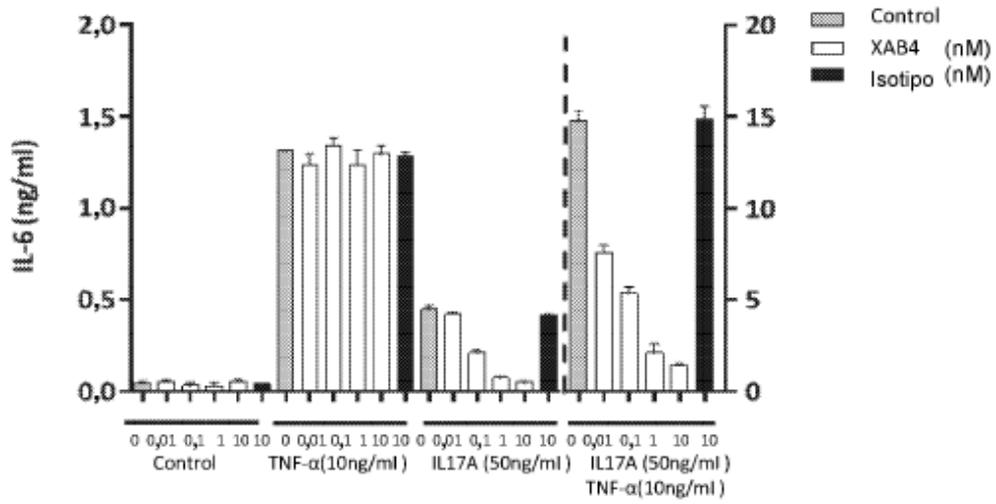


Fig. 21A

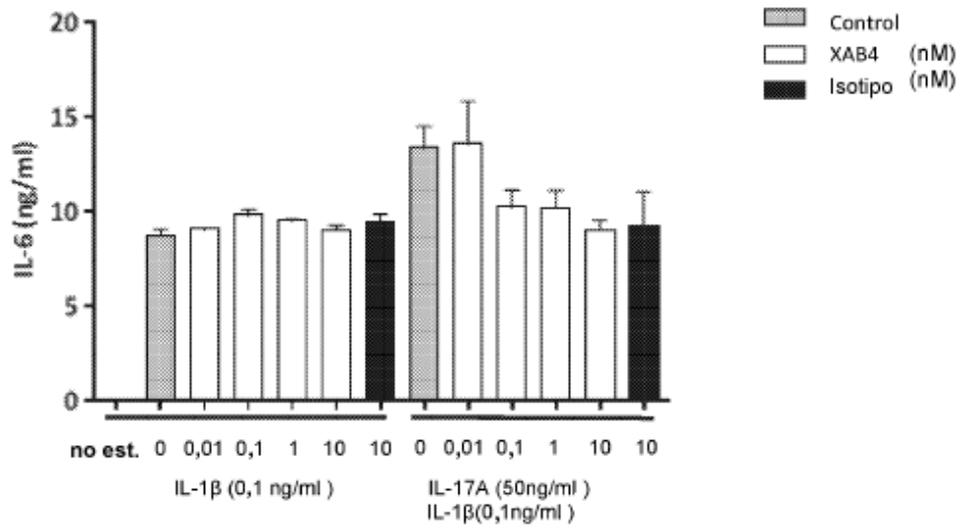


Fig. 21B

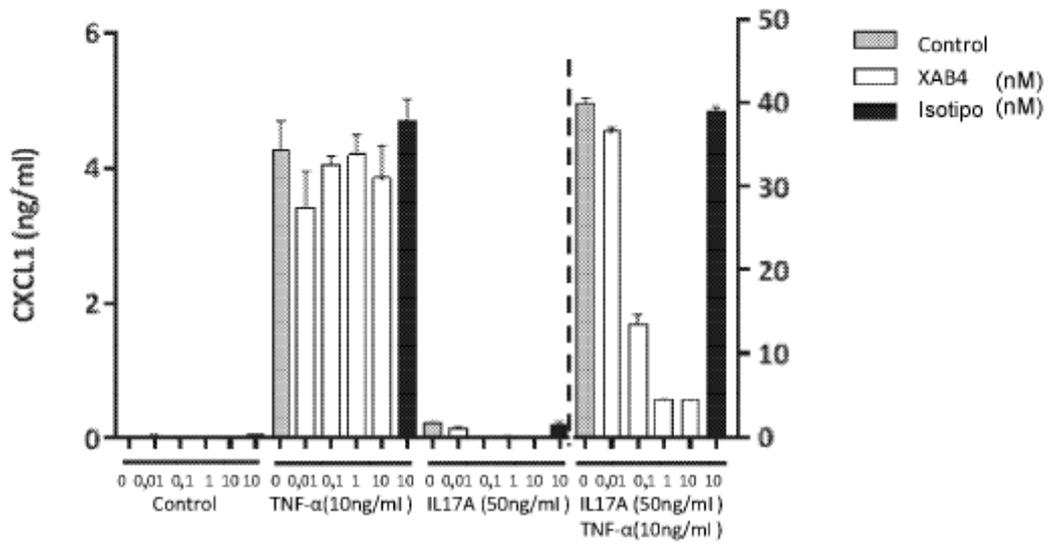


Fig. 22A

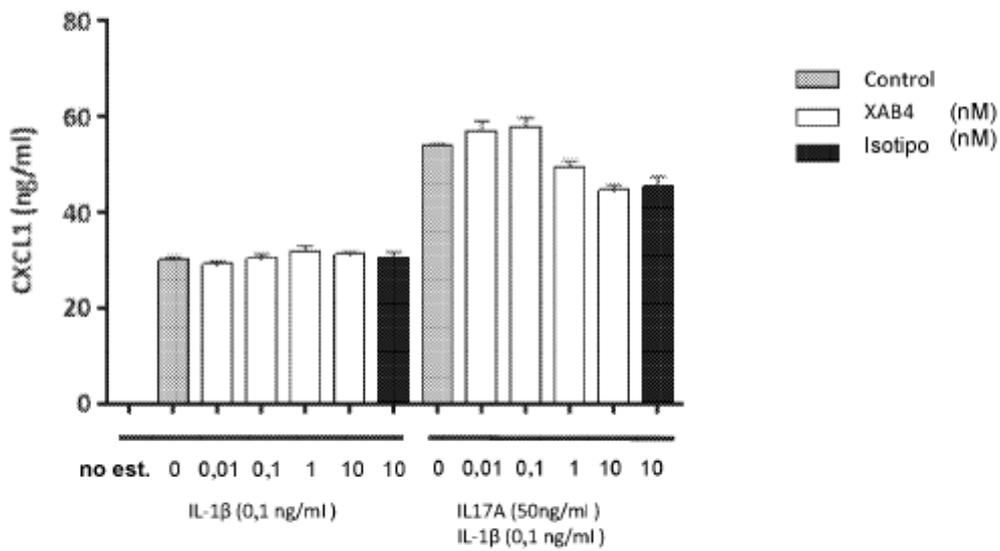


Fig. 22B

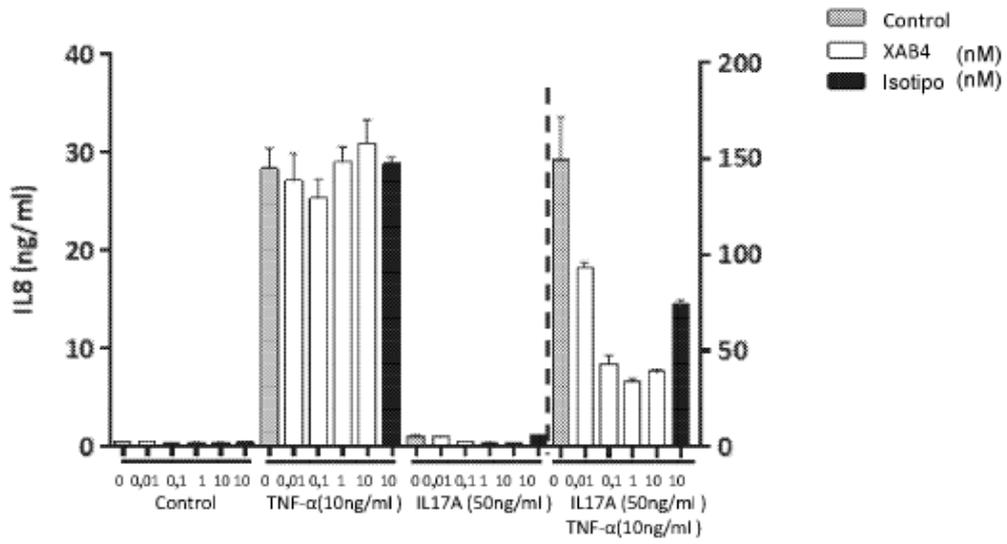


Fig. 23A

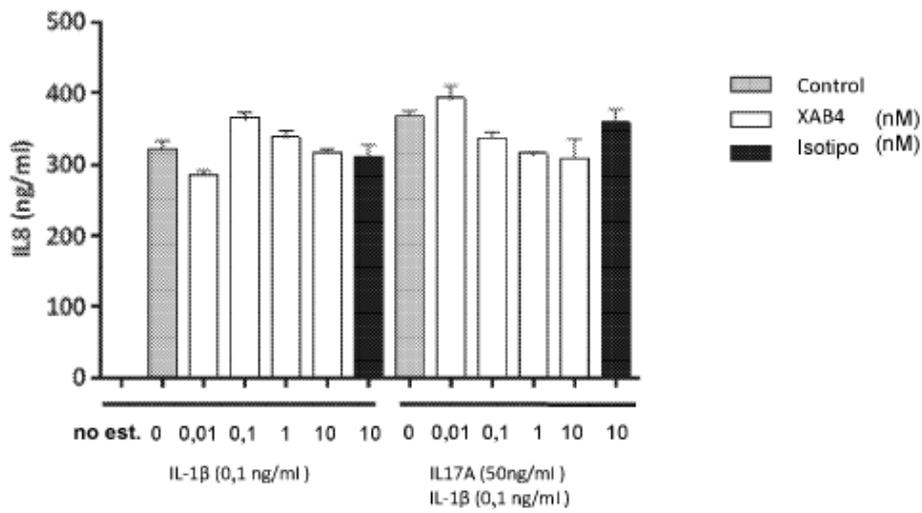


Fig. 23B

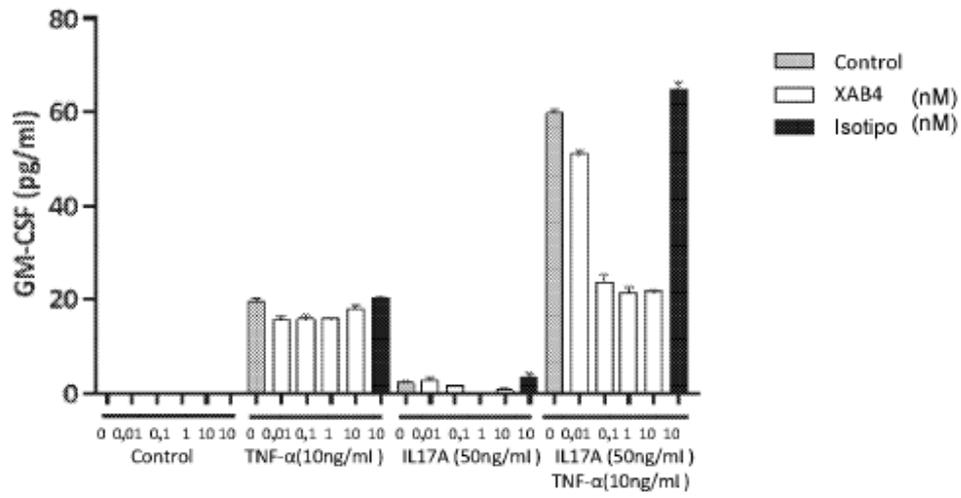


Fig. 24A

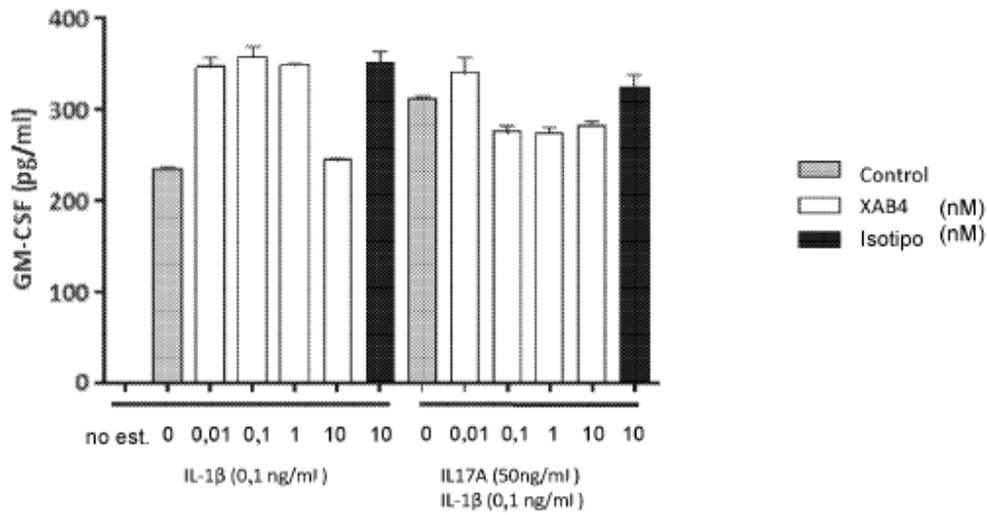


Fig. 24B

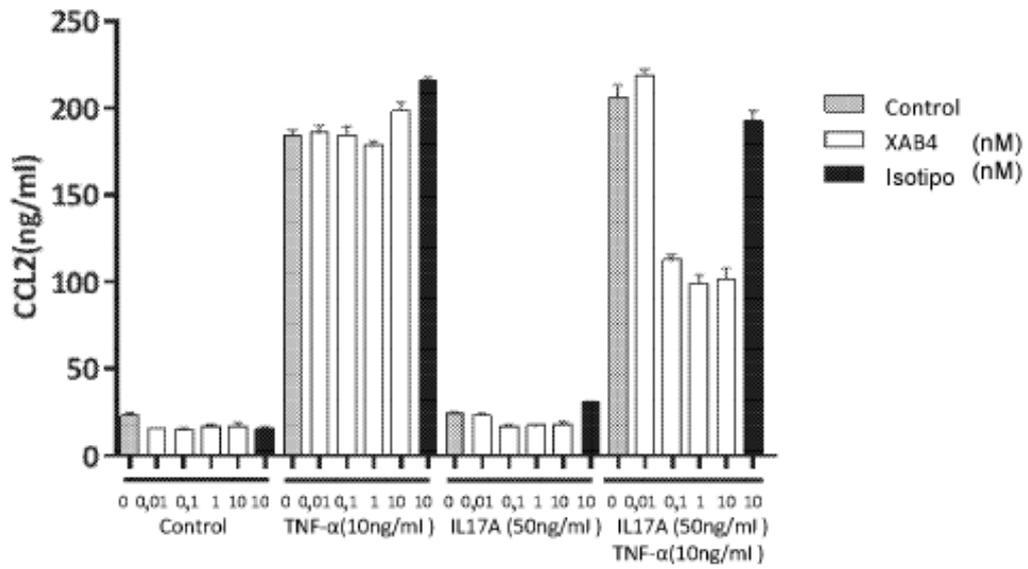


Fig. 25A

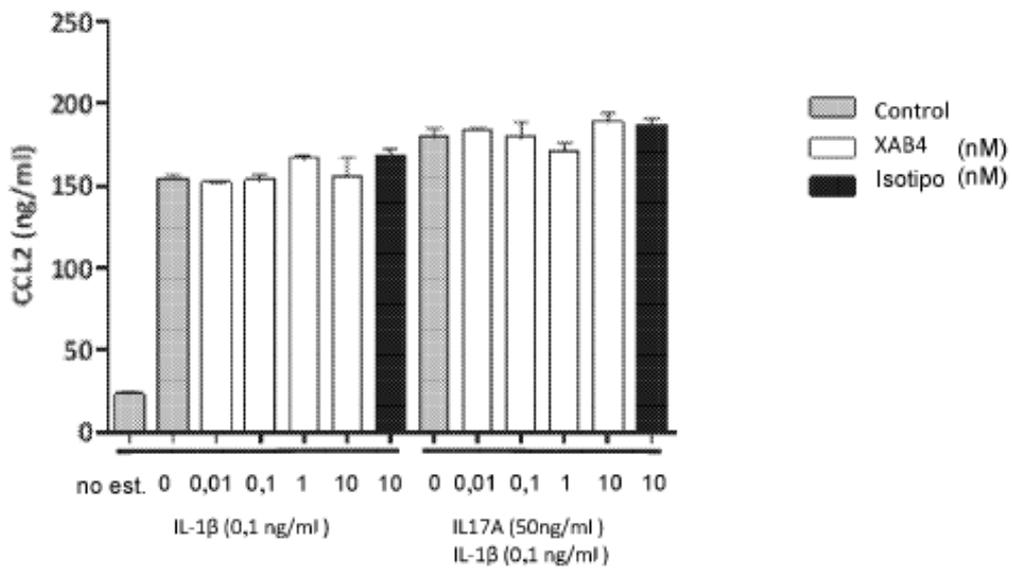


Fig. 25B