

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102022000016722
Data Deposito	04/08/2022
Data Pubblicazione	04/02/2024

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K	16	24

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	39	395

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	37	06

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	K	14	54

Titolo

Nuovo peptide derivato da interleuchina-17A (IL-17A) e anticorpo neutralizzante (Ab17-IPL-1)
--

**“Nuovo peptide derivato da interleuchina-17A (IL-17A) e anticorpo
neutralizzante (Ab17-IPL-1)”**

CAMPO DELL'INVENZIONE

- 5 La presente invenzione riguarda l'identificazione di nuovi target terapeutici e il loro utilizzo nella mitigazione di patologie infiammatorie. In particolare, la presente invenzione riguarda il campo degli anticorpi anti-interleuchina-17A, composizioni farmaceutiche comprendenti detti anticorpi e usi medici degli stessi. Ulteriori aspetti dell'invenzione riguardano un polinucleotide codificante l'anti-interleuchina-17A, vettori
- 10 comprendenti il polinucleotide e cellule ospite che incorporano detti vettori. In un ulteriore aspetto, l'invenzione descrive un peptide per l'identificazione di composti anti-interleuchina-17.

STATO DELLA TECNICA

- 15 Le cellule T helper 17 (Th17) prendono il nome dalla scoperta della citochina che producono, IL-17, le cui attività pleiotropiche includono l'induzione di citochine proinfiammatorie come il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF α), IL-1 e IL-6, nonché chemochine come IL-8 e proteina chemiotattica dei monociti 1 (MCP1) in vari tipi di cellule.
- 20 Le cellule T e le cellule immunitarie innate che producono IL-17 svolgono ruoli protettivi chiave nell'immunità rispetto a patogeni fungini, batterici e a molti patogeni virali e parassiti, ma possono anche mediare l'immunopatologia dannosa associata a infezione o, attraverso l'influenza di fattori genetici e ambientali, portare allo sviluppo di malattie autoimmuni o infiammatorie croniche. L'IL-17 prodotta durante l'infezione da agenti patogeni o microrganismi commensali, sebbene non specifica per gli
- 25 autoantigeni, può indirettamente far precipitare o esacerbare malattie autoimmuni innescando cellule Th17 autoreattive. Infatti, l'IL-17 indotta da infezione o durante l'infiammazione sterile può promuovere risposte infiammatorie che sono centrali in molte patologie diverse, tra cui malattie cardiovascolari e neuroinfiammatorie, asma neutrofila, tempeste di citochine e sepsi, e l'IL-17 è quindi un target farmacologico in

queste malattie.

Gli studi che utilizzano topi knock-out per IL-17 o per il recettore IL-17 (IL-17R) hanno evidenziato un ruolo chiave per questa citochina in diversi modelli animali di malattie autoimmuni, tra cui l'artrite indotta da collagene, l'encefalomielite autoimmune
5 sperimentale, la colite sperimentale e l'asma allergica. La rilevanza clinica di queste scoperte è stata confermata da un numero crescente di studi che esaminano il ruolo di IL-17 nelle malattie infiammatorie croniche, evidenziando l'importanza di questa citochina nell'autoimmunità e nell'infiammazione.

La famiglia IL-17 è composta da sei membri, da IL-17A a IL-17F. IL-17A e F sono i due
10 membri con la più alta omologia strutturale (50%) normalmente presenti come omodimeri o come eterodimeri IL-17A/F. Anche se queste citochine condividono ruoli comuni, IL-17A è più potente e attiva di IL-17F e dei suoi eterodimeri. Altri membri della famiglia (ad eccezione di IL-17E, noto anche come IL-25) sono considerati pro-infiammatori, sebbene i loro ruoli biologici non siano stati completamente chiariti.

15 Collettivamente queste citochine svolgono le loro attività biologiche legandosi con i loro recettori complementari. La famiglia IL-17R comprende cinque subunità, da IL-17RA a IL-17RE. Le subunità IL-17RA e RC interagiscono con IL-17A, IL-17F e IL-17A/F, mentre solo IL-17RA si lega a IL-25, mediando sia le risposte proinfiammatorie sia quelle antinfiammatorie. Tuttavia, IL-17RA ha una maggiore affinità con IL-17A (~100
20 volte) rispetto a IL-17F, mentre ha un'affinità intermedia per l'eterodimero IL-17A/F.

L'attività biologica sia di IL-17A e IL-17F sia di IL-17A/F è normalmente spiegata a causa dell'interazione delle porzioni N- e C-terminali di queste proteine sui propri uno o più recettori. Liu e collaboratori hanno identificato regioni specifiche di interazione tra
25 le citochine della famiglia IL-17 e il proprio recettore: le regioni 1 e 2, formate rispettivamente dalla regione N-terminale e dai filamenti β centrali di IL-17A, che legano il dominio 1 di IL-17RA; e la regione 3, dove la regione C-terminale di IL-17A entra in contatto con il dominio 2 di IL-17RA. La regione 1 è conservata in tutte le citochine IL-17; la regione 2 ha un'interfaccia di legame importante tra IL-17A e IL-17RA a causa di una specifica interazione idrofila; la regione 3 è quasi del tutto unica

per IL-17A in questo sito. L'affinità maggiore o minore di IL-17RA per IL-17A e IL-17F è attribuibile a interazioni multiple formate tra queste regioni e il recettore (Liu et al., 2013, "Crystal structures of interleukin 17A and its complex with IL-17 receptor" A. Nat. Commun 2013;4:1888).

5 Nel processo di infiammazione in corso, la disregolazione della produzione di IL-17A e del legame al suo recettore sono stati associati a diversi disturbi infiammatori, tra cui psoriasi, artrite psoriasica (PsA), artrite reumatoide (RA) e spondilite anchilosante (AS). In quanto tale, questo complesso è un target attraente per gli interventi terapeutici. Infatti, alcuni anticorpi monoclonali (mAb) contro IL-17A sono già efficaci
10 nel trattamento di psoriasi a placche, PsA e AS, come secukinumab e ixekizumab. Nonostante il potente blocco della segnalazione delle citochine offerto dalle terapie biologiche, molti pazienti presentano solo una risposta parziale o transitoria, motivo per cui sono necessarie ulteriori modalità terapeutiche.

I farmaci che antagonizzano le citochine infiammatorie sono usati terapeuticamente
15 per sottoregolare la patologia immuno-mediata nelle condizioni menzionate, sebbene non tutti i pazienti rispondano bene a questo approccio. Pertanto, l'identificazione di potenziali nuovi target terapeutici, come il complesso di segnalazione IL-17, può essere clinicamente rilevante per mitigare la patologia infiammatoria.

La necessità e l'importanza dell'identificazione di un frammento attivo di IL-17A, al fine
20 di poter sviluppare composti anti-IL17A come anticorpi neutralizzanti utili nel trattamento di malattie infiammatorie e immuno-mediate, sono sempre più sentite.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Il problema alla base della presente invenzione riguarda la messa a disposizione di composti che consentano di neutralizzare anti-IL17A. Questo problema viene risolto
25 mediante l'identificazione di un anticorpo isolato anti-interleuchina-17A, in cui detto anticorpo comprende: a. una Catena Pesante (HC) avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO: 3; e B. una Catena Leggera (LC) avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO: 5.

In un secondo aspetto, l'invenzione riguarda un polinucleotide codificante l'anticorpo anti-interleuchina-17A.

Secondo un terzo aspetto, come qui descritto, l'invenzione riguarda un vettore comprendente il polinucleotide codificante l'anticorpo anti-interleuchina-17A, in cui il
5 vettore è opzionalmente un vettore di espressione.

In un quarto aspetto, l'invenzione concerne una cellula ospite comprendente il vettore comprendente il polinucleotide codificante l'anticorpo anti-interleuchina-17A, in cui detta cellula ospite è procariote, eucariote o di mammifero.

Secondo un quinto aspetto, l'invenzione riguarda una composizione farmaceutica
10 comprendente (i) l'anticorpo anti-interleuchina-17A o (ii) il polinucleotide come qui descritto, in cui la composizione opzionalmente comprende inoltre carrier e/o eccipienti farmaceuticamente accettabili.

Secondo un sesto aspetto, la presente invenzione descrive un anticorpo anti-interleuchina-17A o una composizione farmaceutica come qui definita, per l'uso come
15 medicamento.

In un settimo aspetto, come qui descritto, è l'uso del peptide di SEQ ID NO:1, per l'identificazione di composti anti-interleuchina-17.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

Le caratteristiche e i vantaggi della presente invenzione risulteranno evidenti dalla
20 descrizione dettagliata di seguito riportata, dagli Esempi forniti a titolo illustrativo e non limitativo e dalle allegate Figure 1-13.

Figura 1: Mostra un'illustrazione del gene codificante l'anticorpo Ab17-IPL-1 (adattatori 5' e 3' aggiunti).

Figura 2: Le cellule di fibroblasti embrionali di topo NIH3T3 sono state trattate con
25 veicolo IL-17 (Ctrl), IL-17 (50 ng/ml) da solo (IL-17) o peptide (FM-0410) (50 ng/ml) e i surnatanti sono stati analizzati mediante Elisa per IL-6. I dati sono stati espressi come pg/ml e presentati come medie $\pm$ S.D. di tre esperimenti indipendenti separati. L'analisi statistica è stata condotta mediante ANOVA unidirezionale seguita da quella di

Bonferroni per confronti multipli. $##P \leq 0.01$, $###P \leq 0.005$ vs gruppo Ctrl; $*P \leq 0.05$ vs gruppo IL-17.

Figura 3: I topi sono stati trattati con veicolo IL-17 (Ctrl), IL-17 (1 $\mu\text{g}/\text{topo}$) da solo (IL-17) o peptide (FM-0410) (1 $\mu\text{g}/\text{topo}$) e successivamente il numero totale di cellule degli essudati infiammatori delle sacche è stato valutato a 24 h. I dati sono stati espressi come milioni di cellule per sacca e presentati come medie $\pm$ S.D. di $n=7$ topi per gruppo. L'analisi statistica è stata condotta mediante ANOVA unidirezionale seguita da quella di Bonferroni per confronti multipli. $##P \leq 0.01$, $###P \leq 0.005$ vs gruppo Ctrl; $*P \leq 0.05$ vs gruppo IL-17.

Figura 4: I surnatanti infiammatori ottenuti dalle cavità della sacca sono stati analizzati utilizzando un Proteome Profiler Cytokine Array per Ctrl, IL-17 e gruppo sperimentale FM-0410. L'analisi densitometrica è presentata come heatmap. I dati (espressi come INT/ mm^2) sono presentati come medie $\pm$ S.D. dei punti positivi di tre esperimenti indipendenti eseguiti ciascuno con $n=7$ topi per gruppo.

Figura 5: I topi sono stati trattati con veicolo IL-17 (Ctrl), IL-17 (1 $\mu\text{g}/\text{topo}$) o peptide (FM-0410) (1 $\mu\text{g}/\text{topo}$) e i fluidi infiammatori sono stati analizzati mediante Elisa per IL-6. I dati sono stati espressi come pg/ml e presentati come medie $\pm$ S.D. di $n=7$ topi per gruppo. L'analisi statistica è stata condotta mediante ANOVA unidirezionale seguita da quella di Bonferroni per confronti multipli. $##P \leq 0.01$ vs Gruppo CTRL.

Figura 6: Le cellule di fibroblasti embrionali di topo NIH3T3 sono state trattate con veicolo IL-17 (Ctrl), IL-17 (50 ng/ml) e peptide (FM-0410, 50 ng/ml) da soli o in somministrazione con anticorpo neutralizzante IL-17 (Ab17, 750 ng/ml) e i surnatanti sono stati analizzati mediante Elisa per IL-6. I dati sono stati espressi come pg/ml e presentati come medie $\pm$ S.D. di tre esperimenti indipendenti separati. L'analisi statistica è stata condotta mediante ANOVA unidirezionale seguita da quella di Bonferroni per confronti multipli. $##P \leq 0.01$, $###P \leq 0.005$ vs Gruppo CTRL; $^{\circ}P \leq 0.05$ vs Gruppo IL-17; $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$ vs rispettivi gruppi.

Figura 7. I topi sono stati trattati con veicolo FM-0410 (Ctrl), peptide (FM-0410) (1 $\mu\text{g}/\text{topo}$) da solo o co-somministrato con gli anticorpi neutralizzanti IL-17 (Ab17) (A),

KC (Anti-KC) e JE (Anti-JE) (B) (10 µg/topo) e successivamente il numero totale di cellule degli essudati infiammatori delle sacche è stato valutato a 24 h. I dati sono stati espressi come milioni di cellule per sacca e presentati come medie $\pm$ S.D. di n=7 topi per gruppo. L'analisi statistica è stata condotta mediante ANOVA unidirezionale seguita da quella di Bonferroni per confronti multipli. ###P $\leq$ 0.005 vs Gruppo CTRL; *P $\leq$ 0.05, **P $\leq$ 0.01, ***P $\leq$ 0.005 vs Gruppo FM-0410.

Figura 8: Le cellule di fibroblasti embrionali di topo NIH3T3 sono state trattate con il veicolo FM-0410 (Ctrl), FM-0410 (50 ng/ml) da solo o in somministrazione con Clone #9, #12, #14 (75-7500 ng/ml), e i surnatanti sono stati analizzati mediante Elisa per IL-6. I dati sono stati espressi come pg/ml e presentati come medie $\pm$ S.D. di tre esperimenti indipendenti separati. L'analisi statistica è stata condotta mediante ANOVA unidirezionale seguita da quella di Bonferroni per confronti multipli. ###P $\leq$ 0.005 vs Gruppo CTRL; **P $\leq$ 0.01; ***P $\leq$ 0.005 vs Gruppo FM-0410.

Figura 9: Le cellule di neutrofili sono state seminate nella camera superiore che aveva un monostrato confluyente di HDBEC attivate con TNF- α (100 U/ml) e IFN- γ (10 ng/ml) per 24 ore. La migrazione cellulare dopo il trattamento con IL-17 (10-500 ng/ml), FM-0410 (10-500 ng/ml) o N-Formilmetionina-leucil-fenilalanina (fmlp; 10⁻⁶ M) è stata quantificata utilizzando CountBright™ Absolute Counting Beads. I dati sono stati presentati come medie $\pm$ S.D. di n = 3 donatori sani. L'analisi statistica è stata condotta mediante ANOVA unidirezionale seguita da quella di Bonferroni per confronti multipli. #P $\leq$ 0.05, ##P $\leq$ 0.01, ###P $\leq$ 0.001, ####P $\leq$ 0.0001 vs Gruppo CTRL; +P $\leq$ 0.05 vs IL-17.

Figura 10: Le cellule endoteliali dermiche del sangue umane (HDBEC) sono state trattate con: veicolo IL-17 (Ctrl), IL-17 o FM-0410 (100 ng/ml), da soli o in combinazione con TNF- α (100U/ml) per 24 h. Le cellule sono state lavate, selezionate elettronicamente (gate) nella loro totalità e isolate singolarmente prima dell'identificazione dell'espressione di IL-17Rs (RA e RC) (A, B), ICAM (C) e VCAM (D). I valori dell'istogramma (espressi come MIF) indicano le cellule positive totali (AD). In (E) sono mostrate micrografie a contrasto di fase di monostrati di HDBEC confluenti non trattate o trattate (come riportato in precedenza). L'adesione totale (espressa

come INT/mm², F) e la % di trasmigrazione (G) sono calcolate con il programma Image Pro (DataCell, Finchampstead). I surnatanti infiammatori di tutte le condizioni sperimentali sono stati analizzati mediante Elisa per IL-6 (H) espressa in pg/ml. I dati sono stati presentati come medie $\pm$ S.D. di n = 3 donatori sani. L'analisi statistica è stata condotta mediante ANOVA unidirezionale seguita da quella di Bonferroni per confronti multipli. #P $\leq$ 0.05, ##P $\leq$ 0.01, ###P $\leq$ 0.001, ####P $\leq$ 0.0001 vs Gruppo CTRL; *P $\leq$ 0.05 vs TNF- α + Gruppo IL-17; °P $\leq$ 0.05, °°P $\leq$ 0.001, °°°P $\leq$ 0.0001 vs gruppo TNF- α .

Figura 11: I fibroblasti umani di pazienti "in risoluzione" (Resolving) e RA sono stati stimolati per 24 h con IL-17 (10 ng/ml) e TNF- α (100 U/ml) da soli o in combinazione (30 minuti prima) con MAB421 (10 μ g/ml) o Ab17-IPL-1 (10 μ g/ml) e i surnatanti sono stati quindi analizzati mediante Elisa per IL-6. I dati sono stati espressi come pg/ml e presentati come medie $\pm$ S.D. di tre esperimenti indipendenti separati. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando l'analisi della varianza con post-test di Bonferroni per confronti multipli. ###P $\leq$ 0.001 vs il proprio Gruppo CTRL; **P $\leq$ 0.01 vs gruppo RA IL-17; +P $\leq$ 0.05 vs gruppo Res IL-17.

Figura 12: Risultati dell'amplificazione PCR della Catena Pesante, HC (A) e della Catena Leggera, LC (B): HC1-HC2: la Catena Pesante (peso molecolare di circa 1400 bp) è stata amplificata utilizzando 2 diversi set di primer per aumentare le possibilità di successo. LC1-LC2: La Catena Leggera (peso molecolare di circa 750 bp) è stata amplificata utilizzando 2 diversi set di primer per aumentare le possibilità di successo. MW: peso molecolare standard.

Figura 13: Validazione PCR dopo la clonazione. I cloni 1-7 di HC (A) e i cloni 1-8 di LC (B) sono stati validati ed è stato confermato che avevano la dimensione corretta (rispettivamente circa 1400 bp e 750 bp). I cloni sono stati sequenziati. MW: peso molecolare standard.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione fornisce un anticorpo isolato che si lega all'interleuchina-17A e suoi usi. Vengono inoltre fornite composizioni farmaceutiche, nonché un peptide per l'identificazione di composti che si legano all'interleuchina-17A.

Tutte le terapie attualmente autorizzate per la via IL-17–IL-17R sono mAb. Alcuni sono

5 stati associati ad effetti collaterali, tra cui una maggiore infiammazione intestinale nei pazienti con IBD trattati con secukinumab o brodalumab (Hueber, W. et al. 2021. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* 61, 1693–1700), pensieri suicidi in alcuni pazienti con psoriasi trattati con
10 brodalumab (Schmidt, C. 2015. Suicidal thoughts end Amgen's blockbuster aspirations for psoriasis drug. *Nat. Biotechnol.* 33, 894–895), e infezioni potenziate da Candida o del tratto respiratorio superiore in pazienti trattati con una gamma di mAb che hanno come target la via IL-17–IL-17R (Reich, K. et al. 2021. Bimekizumab versus Secukinumab in plaque psoriasis. *N. Engl. J. Med.* 385, 142–152; Warren, R. B. et al.
15 2021. Bimekizumab versus Adalimumab in plaque psoriasis. *N. Engl. J. Med.* 385, 130–141). I farmaci a piccole molecole (SMD) presentano vantaggi non solo per quanto riguarda i costi di produzione e la facilità di veicolazione, ma anche per quanto riguarda il potenziale di riduzione degli effetti collaterali correlati a infezione. A differenza dei prodotti biologici, che bloccano cronicamente la produzione di IL-17, gli SMD hanno
20 maggiori probabilità di attenuare transitoriamente la produzione di IL-17, il che può interrompere il ciclo dell'infiammazione senza sopprimere gli effetti protettivi dell'IL-17 contro le infezioni. Tuttavia, la tossicità off-target può essere un problema con alcuni SMD. Pertanto, vi è la necessità di SMD orali biodisponibili sicuri ed efficaci che blocchino la via IL-17–IL-17R. A causa del duplice ruolo di IL-17 nell'immunità protettiva
25 e nell'infiammazione dannosa, un approccio alternativo e più mirato può essere quello di sfruttare i meccanismi immunoregolatori naturali dell'ospite che sopprimono selettivamente le risposte di IL-17 agli autoantigeni o in specifici tessuti malati. L'induzione selettiva di cellule Treg o terapie cellulari con cellule Treg espanse *in vitro* hanno già dimostrato il "proof-of-principle" in modelli animali e, sebbene non abbiano

ancora ottenuto un grande successo negli studi clinici sull'uomo, potrebbero fornire un approccio sicuro ed efficace per il trattamento delle malattie autoimmuni nell'uomo.

L'anticorpo della presente invenzione, qui indicato anche come Ab17-IPL-1, è un anticorpo monoclonale con molte proprietà vantaggiose che derivano anche dal fatto
5 che è stato identificato dall'esatta regione di legame su IL-17A e quindi ha una sequenza aminoacidica corta. Come verrà ulteriormente discusso in seguito e dimostrato con i dati sperimentali disponibili, l'anticorpo monoclonale dell'invenzione possiede un'elevata specificità e può essere utilizzato come medicamento grazie alle sue caratteristiche tecniche.

- 10 La presente invenzione concerne quindi un anticorpo isolato anti-interleuchina-17A, in cui detto anticorpo comprende a. una Catena Pesante (HC) avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO: 3; e b. una Catena Leggera (LC) avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO: 5.

In un aspetto preferito, l'anticorpo isolato anti-interleuchina-17A dell'invenzione
15 comprende 6 regioni CDR, dette regioni CDR essendo:

- a. una HC-CDR1 avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO: 6;
- b. una HC-CDR2 avente la sequenza aminoacidica di; SEQ ID NO:7;
- c. una HC-CDR3 avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO:8;
- d. una LC-CDR1 avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO:9;
- 20 e. una LC-CDR2 avente la sequenza aminoacidica di STS (Ser-Thr-Ser); e
- f. una LC-CDR3 avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO:10.

Ai fini della presente divulgazione, ciascuna sequenza ha un corrispondente SEQ ID NO. come segue:

- 25 SEQ ID NO. 1 corrisponde alla sequenza aminoacidica del peptide FM-0410:
Ac-LEKILVSVGATAVTPIVHHVAC (SEQ ID NO:1).

SEQ ID NO. 2 corrisponde alla sequenza di DNA della Catena Pesante (Identica per tutti i cloni), sequenza di DNA HC (1332bp, **CDR in grassetto**, regione costante IgG1 sottolineata: FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4-CH-Stop):

GAAGTGATACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCT
 GAAACTCTCCTGTGCAGCCTCT**GGATTCACTTTCAGTAGCTATGCC**ATGTCTTG
 GGTTCCGCCAGACTCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGCAACC**ATTACTGGTG**
GTGGTACTTATATTTATTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAG
 5 AGACAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGA
 CACGGCCATGTATTTCTGT**GCAAGGATCTACGGTCGTA**ACTACTACTTT**GA**CTA
CTGGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCCCCATC
TGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCCAAACTA**ACTCCATGGTGACCCT**
GGGATGCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTC
 10 TGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCT
CTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGA
CCGTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAA
ATTGTGCCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTAT
CATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGAC
 15 TCCTAAGGTCACGTGTGTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCA
GTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCG
GGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACTTCCCATCATGCA
CCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTT
CCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCC
 20 ACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAG
TCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAG
TGGAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAAACTCAGCCCATCATGGACAC
AGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGA
GGCAGGAAATACTTTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACCA
 25 TACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCCTGGTAAATAG.

SEQ ID NO. 3 corrisponde alla sequenza aminoacidica della Catena Pesante,
 sequenza aminoacidica HC (443aa, **CDR in grassetto**, regione costante IgG1
sottolineata: FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4-CH-Stop):

EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS**GFTFSSY**AMSWVRQTPEKRLEWVATITGGGT
 YIYYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLRSEDAMYFC**ARIYGRNYYFDY**WGQG
 TTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSG
VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKP
 5 CICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTA
QTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPK
APQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDT
DGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK-

SEQ ID NO. 4 corrisponde alla sequenza DNA della **Catena Leggera** (Identica per tutti
 10 i cloni), sequenza di DNA LC (639bp, **CDR in grassetto**, regione costante Kappa
sottolineata: FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4-CLKappa-Stop):

CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAGGAG
 ATCACCTAACCTGCAGTGCCAACT**CGAGTGTTACTTAC**ATGCACTGGTACCAG
 CAGAAAGTCAGGCACTTCTCCCAAACCTCTTGATTTAT**AGCACATCCA**ACCTGGCTT
 15 CTGGAGTCCCTTCTCGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTTTTATTCTCTCA
 CAATCAGCAGTGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCGATTATTACTGCC**CATCAGTGGA**
GTAGTTATCGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCCAACGGGCTGAT
GCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGA
GGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCA
 20 AGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTG
ATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCA
AGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACAT
CAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAG

SEQ ID NO. 5 corrisponde alla sequenza aminoacidica della sequenza aminoacidica
 25 LC (212aa, **CDR in grassetto**, regione costante Kappa sottolineata: FR1-**CDR1**-FR2-
CDR2-FR3-**CDR3**-FR4-CLKappa-Stop):

QIVLTQSPAIMSASLGEEITLTCSAN**SSVTY**MHWYQQKSGTSPKLLI**STSN**LASGVP
 SRFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYY**CHQWSSYRT**FGGGTKLEIQRADAAPT**VS**I

FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTY
SMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRENC

SEQ ID NO: 6 corrisponde alla sequenza aminoacidica della regione HC-CDR1.

SEQ ID NO: 7 corrisponde alla sequenza aminoacidica della regione HC-CDR2.

5 SEQ ID NO: 8 corrisponde alla sequenza aminoacidica della regione HC-CDR3.

SEQ ID NO: 9 corrisponde alla sequenza aminoacidica della regione LC-CDR1.

La sequenza aminoacidica della LC-CDR2 avendo la sequenza aminoacidica di STS (Ser-Thr-Ser).

SEQ ID NO: 10 corrisponde alla sequenza aminoacidica della regione LC-CDR3.

10

Preferibilmente l'anticorpo isolato anti-interleuchina-17A dell'invenzione è un anticorpo monoclonale, un anticorpo chimerico e/o è umanizzato o umano.

L'obiettivo principale del processo di umanizzazione è ridurre l'immunogenicità degli anticorpi al fine di migliorare la tolleranza negli esseri umani e migliorare le loro proprietà biofisiche.

15

Il termine "anticorpo monoclonale" come qui utilizzato si riferisce ad un anticorpo ottenuto da una popolazione di anticorpi sostanzialmente omogenei, cioè i singoli anticorpi che compongono la popolazione sono identici ad eccezione di possibili mutazioni, per esempio mutazioni naturalmente presenti in natura, che possono essere presenti in quantità minori. Pertanto, il modificatore "monoclonale" indica che il carattere dell'anticorpo è di non essere una miscela di anticorpi distinti.

20

Gli anticorpi possono essere preparati mediante tecniche diverse. Per esempio, gli anticorpi monoclonali possono essere purificati da cellule che li esprimono naturalmente, come le cellule di ibridoma, o prodotti in un sistema di espressione ricombinante sia da sistema di mammiferi che da procarioti (per esempio *Escherichia Coli*). Più recentemente, nella pratica clinica sono stati introdotti i frammenti anticorpali. In effetti, i frammenti anticorpali stanno emergendo come ottimi strumenti nell'imaging e nella diagnostica perché sono in grado di rilevare proteine cellulari con elevata affinità e specificità. I frammenti anticorpali includono, ma non sono limitati a: Fab, F(ab')₂,

25

anticorpi a catena singola, nanobody, diabody, triabody, tetrabody e anticorpi di dominio. Essi possono essere facilmente collegati a radioisotopi, molecole fluorescenti o enzimi che contrassegnano specifici biomarcatori nei pazienti. Hanno anche un'emivita più breve nel corpo, fatto che si traduce in una clearance più rapida e può
5 comportare minori rischi di effetti collaterali da agenti diagnostici potenzialmente invasivi. Ove desiderato, l'affinità dell'anticorpo monoclonale o del frammento anticorpale secondo l'invenzione, contenente una o più delle CDR sopra menzionate, può essere migliorata mediante procedure di maturazione dell'affinità.

Più preferibilmente l'anticorpo isolato anti-interleuchina-17A dell'invenzione si lega al
10 peptide di SEQ ID NO:1.

Le proprietà vantaggiose dell'anticorpo della presente invenzione risulteranno evidenti nella sezione sperimentale.

In particolare, l'anticorpo anti-IL17A qui descritto (Ab17-IPL-1) è un anticorpo monoclonale e quindi presenta un'elevata specificità come neutralizzante anti-IL17A
15 rispetto agli anticorpi policlonali.

Inoltre, Ab17-IPL-1 ha il vantaggio di avere una sequenza corta rispetto ad altri anticorpi monoclonali anti-IL17A noti (più o meno 10 volte in termini di sequenza antigenica correlata ad AA) e questa caratteristica permette di evitare il legame non specifico che può derivare dalla sequenza aminoacidica più lunga. Oltre a quanto
20 sopra, una sequenza più corta potrebbe, molto probabilmente, comportare minori costi di produzione e vantaggi di produzione. Questo aspetto è dannoso per future applicazioni cliniche.

In un secondo aspetto, l'invenzione riguarda un polinucleotide codificante l'anticorpo anti-interleuchina-17A.

25 Secondo un terzo aspetto, come qui descritto, l'invenzione riguarda un vettore comprendente il polinucleotide codificante l'anticorpo anti-interleuchina-17A, in cui il vettore è opzionalmente un vettore di espressione.

In un quarto aspetto, l'invenzione concerne una cellula ospite comprendente il vettore comprendente il polinucleotide codificante l'anticorpo anti-interleuchina-17A, in cui detta cellula ospite è procariote, eucariote o di mammifero.

5 Secondo un quinto aspetto, l'invenzione riguarda una composizione farmaceutica comprendente (i) l'anticorpo anti-interleuchina-17A o (ii) il polinucleotide come qui descritto, in cui la composizione opzionalmente comprende inoltre carrier e/o eccipienti farmaceuticamente accettabili.

Una composizione farmaceutica può opzionalmente contenere altri principi attivi. Il termine "carrier" si riferisce a un veicolo, eccipiente, diluente o adiuvante con cui viene
10 somministrato il principio attivo o terapeutico. Qualsiasi carrier e/o eccipiente adatto per la forma di preparazione desiderata per la somministrazione è contemplato per l'uso con ceppi/parete/postbiotico qui divulgati.

Il carrier può assumere un'ampia varietà di forme in funzione della forma di preparazione desiderata per la somministrazione, per esempio orale o parenterale,
15 inclusa la via endovenosa. Nella preparazione delle composizioni per la forma di dosaggio orale, può essere impiegato qualsiasi mezzo farmaceutico usuale, quale, per esempio, acqua, glicoli, oli, alcoli, agenti aromatizzanti, conservanti, agenti coloranti e simili nel caso di preparazioni liquide orali, quali, per esempio, sospensioni, elisir e soluzioni; o carrier quali amidi, zuccheri, cellulosa microcristallina, diluenti, agenti
20 granulanti, lubrificanti, leganti, agenti disgreganti e simili nel caso di preparazioni solide orali quali, per esempio, polveri, capsule rigide e molli e compresse, le preparazioni orali solide essendo preferite rispetto alle preparazioni liquide.

Secondo un sesto aspetto la presente invenzione descrive un anticorpo anti-interleuchina-17A o una composizione farmaceutica come qui definita, per l'uso come
25 medicamento.

In particolare, l'anticorpo anti-interleuchina dell'invenzione può essere utilizzato nel trattamento dell'infiammazione, di malattie autoimmuni e per il trattamento della disregolazione della produzione di IL-17A, che è stata associata a diversi disturbi

infiammatori e autoimmuni, tra cui psoriasi, artrite psoriasica (PsA), artrite reumatoide (RA) e spondilite anchilosante (AS).

In un settimo aspetto, è qui descritto un peptide avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO: 1 e l'uso del peptide di SEQ ID NO:1 per l'identificazione di composti anti-interleuchina-17.

Il peptide di SEQ ID NO:2 è un corto frammento peptidico corrispondente alla regione attiva di IL-17 a lunghezza intera. Come risulterà evidente dagli Esempi, abbiamo definito l'attività biologica *in vitro* del peptide di SEQ ID NO:1 in termini di produzione di IL-6 dalla linea cellulare 3T3. Il peptide è stato identificato in un modello di infiammazione *in vivo* e ha permesso di identificare un nuovo anticorpo neutralizzante contro la proteina IL-17 utile nel trattamento di malattie infiammatorie e autoimmuni.

Varie forme di realizzazione e aspetti della presente invenzione, come delineato qui sopra e come rivendicato nella sezione delle rivendicazioni che segue, trovano supporto sperimentale nella seguente sezione degli Esempi.

ESEMPI

Esempio 1: Sintesi del peptide

Abbiamo sintetizzato il peptide della presente invenzione, detto peptide è stato chiamato FM-0410 e ha la seguente sequenza aminoacidica: Ac-LEKILVSVGATAVTPIVHHVAC (SEQ ID NO:1)

Metodi: La sintesi del peptide è stata eseguita utilizzando la sintesi peptidica in fase solida assistita da ultrasuoni (US-SPPS), tramite la strategia di protezione ortogonale Fmoc/tBu. Il peptide è stato assemblato su una resina di 2-clorotritil cloruro (2-CTC) (0.1 mmol da 1.70 mmol/g come sostituzione del carico). La resina è stata prima gonfiata in DMF su un agitatore automatizzato per 30 minuti a rt. Quindi, alla resina è stata aggiunta una soluzione di Fmoc-Ala (0.1 mmoli) e DIPEA (0.2 mmoli) in DMF anidra e la sospensione risultante è stata agitata per una notte a temperatura ambiente; i gruppi reattivi cloruro residui sono stati quindi sottoposti a capping aggiungendo una soluzione precedentemente miscelata di DIEA/DCM/MeOH (10:85:5) e agitando blandamente per 1 h. Successivamente la deprotezione dello

Fmoc (con 20% di piperidina in DMF, 0.5 + 1 min di trattamento) e il coupling (mediante HBTU/HOBt come agenti attivanti/additivi, 5 min di trattamento) sono stati ciclicamente eseguiti mediante irradiazione con ultrasuoni fino ad ottenere la sequenza peptidica target legata alla resina. Ciascun passaggio è stato monitorato mediante test Kaiser o
5 del cloranile come saggi colorimetrici, utilizzati rispettivamente per il rilevamento di ammine primarie e secondarie legate in fase solida. La scissione finale è stata eseguita utilizzando un cocktail di TFA/TIS/H₂O, per 3 ore a rt, e i prodotti grezzi sono stati purificati mediante HPLC preparativa in fase inversa. Il peptide esaminato per l'attività biologica è stato purificato a >99% e l'esatto peso molecolare è stato confermato
10 dall'analisi LC-MS.

Esempio 2: Modello *in vitro*

Al fine di valutare l'attività biologica del peptide sintetizzato, abbiamo condotto studi *in vitro* utilizzando cellule di fibroblasti embrionali di topo NIH3T3. La stimolazione dei
15 fibroblasti con IL-17 ha indotto un aumento significativo del rilascio di IL-6 rispetto al gruppo di controllo. È interessante notare che la somministrazione di FM-0410 ha mostrato un rilascio significativo, e più abbondante, di IL-6 rispetto al gruppo trattato con IL-17 (Figura 2).

Con questo sistema *in vitro* abbiamo misurato l'attività di IL-17 in base alla sua capacità
20 di indurre la secrezione di IL6 da parte delle cellule di fibroblasti embrionali di topo NIH3T3.

Esempio 3: Modello *in vivo* della sacca d'aria

Solo pochi studi hanno dimostrato che IL-17 induce infiltrazione polimorfonucleare
25 (PMN) in cavità come il peritoneo o il polmone. Nei nostri esperimenti, la risposta infiammatoria indotta da IL-17 nella sacca d'aria era molto maggiore in termini sia di infiltrato cellulare che di produzione di citochine. Senza essere vincolati ad alcuna teoria, ciò potrebbe essere spiegato dalla rilevanza specifica di IL-17 in un tessuto pre-infiammato e in un microambiente cellulare "innescato" per esercitare il suo pieno

potenziale. Va infatti considerato che sia il peritoneo che il polmone sono siti sottoposti a immunosorveglianza e, come tali, sotto continuo controllo del sistema immunitario adattativo e innato. Al contrario, la sacca d'aria è una struttura di nuova formazione che ha origine come risultato di una riorganizzazione dei tessuti non riconosciuta (e
5 infiammata entro il giorno 6). Studi seminali che hanno utilizzato la sacca d'aria hanno suggerito che la risposta infiammatoria in questo modello assomiglia in parte agli ambienti infiammatori trovati nella sinovia di pazienti con AR. I fluidi sinoviali contengono un gran numero di PMN e cellule T; si ritiene che la loro presenza guidi la distruzione e l'erosione dell'articolazione. L'IL-17 prodotta localmente probabilmente
10 dalle cellule T di memoria attivate così come dai neutrofili potrebbe essere il fattore chiave per l'esacerbazione dei circuiti infiammatori locali.

Sapevamo dai nostri studi precedenti (Maione et al., 2009 "Interleukin 17 sustains rather than induces inflammation". *Biochem Pharmacol* 2009;77, 878-87; Maione et al., 2018 "Repetitive Exposure of IL-17 into the murine air pouch favors the recruitment
15 of inflammatory monocytes and the release of IL-16 and TREM-1 in the inflammatory fluids", *Front Immunol* 2018; 2752) che una singola somministrazione di IL-17 (1 µg/sacca) in una sacca d'aria di 6 giorni provoca un'infiltrazione transitoria di leucociti entro 4 ore, che raggiunge il picco a 24 h e poi diminuisce entro 48 ore. Per questi motivi abbiamo selezionato 24 h come nostro timepoint sperimentale specifico. Per
20 testare la potenziale azione di risposta del peptide in questo sito locale di infiammazione, abbiamo somministrato il peptide (FM-0410) alla dose di 1 µg/topo e abbiamo confrontato poi il suo effetto al peptide prototipo IL-17. Coerentemente con i nostri risultati precedenti, 24 h dopo la somministrazione di IL-17 i topi hanno mostrato differenze significative nel numero di leucociti infiammatori rispetto al gruppo di
25 controllo. È interessante notare che i topi a cui è stato iniettato il peptide FM-0410 hanno mostrato un marcato aumento degli infiltrati infiammatori rispetto al controllo ma anche rispetto ai topi trattati con IL-17. (Figura 3).

In particolare, sacche d'aria dorsali sono state preparate mediante iniezione di 2.5 ml di aria il giorno 0 e il giorno 3 come precedentemente descritto (Maione et al., 2009). Il

giorno 6, i topi hanno ricevuto i seguenti trattamenti: i) CTRL, 0.25 ml di carbossimetilcellulosa (CMC) allo 0.5%; ii) IL-17 (1 µg) in 0.25 ml di CMC allo 0.5%; iii) FM-0410 (1 µg) in 0.25 ml di CMC allo 0.5%; iv) FM-0410 + anticorpo neutralizzante IL-17 (Ab17; 10 µg) in 0.25 ml di CMC allo 0.5%; v) FM-0410 + anticorpo neutralizzante KC (Anti-KC; 10 µg) in 0.25 ml di CMC allo 0.5%; vi) FM-0410 + anticorpo neutralizzante JE (Anti-JE; 10 µg) in 0.25 ml di CMC allo 0.5%. I topi sono stati sacrificati dopo 24 h dall'iniezione e le sacche d'aria sono state lavate accuratamente con 2 ml di PBS contenente 50 U/ml di eparina e EDTA 3 mM. I fluidi di lavaggio sono stati centrifugati a 220×g per 10 minuti a 4°C per separare gli essudati dalle cellule reclutate. Gli essudati infiammatori sono stati raccolti e misurati per valutare il livello di cito-chemochine infiammatorie. Il numero di cellule è stato determinato mediante contatore di cellule automatizzato TC20 (Bio-Rad, Milano, Italia) utilizzando vetrini monouso per contatore di cellule automatizzato TC20 di Bio-Rad, colorante trypan blue TC20 (colorante trypan blue allo 0,4% p/v in cloruro di sodio allo 0.81% e soluzione bibasica di fosfato di potassio allo 0.06%) e una telecamera CCD per contare le cellule sulla base dell'analisi delle immagini di cattura (Maione et al., 2018).

Materiali: Gli anticorpi neutralizzanti di topo ricombinante IL-17, IL-17 (Ab17), KC (Anti-KC) e JE (Anti-JE) sono stati acquistati da R&D System (Milano, Italia).

Esempio 4: Saggi Elisa ed Elisa Spot

È stato utilizzato un approccio obiettivo (array proteico prefabbricato) basato sulla profilazione di citochine e chemochine presenti nei fluidi infiammatori. Come mostrato nella Figura 4, il fluido della sacca ottenuto da topi iniettati con IL-17 ha mostrato un aumento significativo del profilo delle cito-chemochine rispetto al gruppo ctrl. Confrontando i fluidi della sacca dal gruppo trattato con FM-0410 rispetto al gruppo IL-17, abbiamo osservato una sovraregolazione selettiva in una serie di mediatori. Nello specifico, l'analisi densitometrica ha rivelato che il gruppo trattato con FM-0410 aveva una modulazione specifica, nei seguenti fattori: chemioattrattore dei linfociti B (BLC), componente del complemento 5a (C5a), molecola-1 di adesione intercellulare solubile

(sICAM-1), IL-1 β , IL-16, proteina-10 indotta dall'interferone γ (IP-10), chemioattrattore dei cheratinociti (KC), fattore stimolante le colonie di macrofagi (MCSF), epitelio giunzionale (JE), proteina-5 chemioattrattore dei monociti (MCP-5), monochina indotta dall'interferone γ (MIG), proteine infiammatorie dei macrofagi (MIP), regolati in seguito ad attivazione, linfociti T normali espressi e secreti (RANTES), inibitore della metalloproteinasi-1 (TIMP-1) e dal recettore scatenante espresso sulle cellule mieloidi-1 (TREM-1) rispetto al gruppo IL-17.

Inoltre, stati quantificati i livelli di IL-6 sono nei fluidi della sacca. La somministrazione di IL-17 e FM-0410 è stata correlata con un aumento del livello di IL-6 rispetto al gruppo di controllo (Figura 5), confermando in questo modello murino di infiammazione gli effetti biologici osservati negli esperimenti preliminari *in vitro*.

Sono stati condotti ulteriori studi *in vitro*, utilizzando cellule di fibroblasti embrionali di topo NIH3T3, per testare il potenziale effetto neutralizzante di Ab17 sul peptide FM-0410. La stimolazione dei fibroblasti con IL-17 e FM-0410 ha indotto un aumento significativo (come mostrato in entrambe le Figure 2 e 6) di rilascio di IL-6 rispetto al gruppo di controllo, invertito dopo la somministrazione dell'anticorpo neutralizzante IL-17 (Ab17) (Figura 6).

Questi esperimenti sono stati confermati e amplificati da un ulteriore esperimento *in vivo*. Il peptide FM-0410 è stato somministrato alla dose di 1 μ g/topo in questo sito locale di infiammazione ed è stato confrontato il suo effetto dopo la somministrazione di anticorpi neutralizzanti IL-17 (Ab17), KC (Anti-KC) e JE (Anti-JE). Coerentemente con i nostri risultati precedenti, i topi a cui era stato iniettato il peptide FM-0410 hanno mostrato un marcato aumento degli infiltrati infiammatori rispetto ai topi di controllo e trattati con IL-17, che è stato ridotto dopo la somministrazione di anticorpi neutralizzanti (Figura 7).

Metodi: I livelli di IL-6 nei surnatanti infiammatori cellulari e della sacca d'aria a 24 h sono stati misurati utilizzando un kit di saggio immunoassorbente legato a un enzima disponibile in commercio (kit ELISA, R&D System, Milano, Italia) secondo le istruzioni del produttore. In breve, 100 μ l di surnatanti, standard diluiti, controlli di qualità e

tampone di diluizione (bianco) sono stati applicati su una piastra con l'anticorpo monoclonale per 2 h. Dopo il lavaggio, sono stati aggiunti 100 µl di anticorpo marcato con biotina e l'incubazione è continuata per 1 h. La piastra è stata lavata e sono stati aggiunti 100 µl di coniugato streptavidina-HRP e la piastra è stata incubata per un
5 ulteriore periodo di 30 minuti al buio. L'aggiunta di 100 µl di substrato e di soluzione di arresto ha rappresentato gli ultimi passaggi prima della lettura dell'assorbanza (misurata a 450 nm) su un lettore di micropiastre. I livelli di antigene nei campioni sono stati determinati utilizzando una curva standard ed espressi come pg/ml. Per l'array di proteine di cito-chemochine, volumi uguali (1.5 ml) di fluidi infiammatori della sacca in
10 tutte le condizioni sperimentali descritte sono stati incubati con le membrane dell'array di profiler del proteoma prerivestite secondo le istruzioni del produttore. I "dot plot" sono stati rilevati utilizzando il kit di rilevamento della chemiluminescenza potenziata e il software Image Quant 400 GE Healthcare (GE Healthcare, Italia) e successivamente quantificati utilizzando il software del densitometro per imaging GS 800 (Biorad, Italia)
15 come descritto in precedenza (Maione et al., 2018).

Materiali: Il kit IL-6 Elisa, il kit di array di citochine di topo profiler di proteoma, sono stati acquistati da R&D System (Milano, Italia).

Esempio 5: Sviluppo di Anticorpi Monoclonali

20 Lo scopo della procedura era la sintesi di un nuovo e più specifico anticorpo neutralizzante avente come target una porzione specifica (e più attiva) di IL-17A che garantisse un'attività neutralizzante terapeutica più prominente e mirata contro questa citochina pro-infiammatoria. A questo scopo, abbiamo condotto uno studio *in vitro*, utilizzando cellule di fibroblasti embrionali di topo NIH3T3, con i migliori cloni ottenuti
25 con il protocollo di immunizzazione (al 5° processo di immunizzazione; Clone #9, #12, #14) che sono stati utilizzati per il finale produzione dell'anticorpo.

La prima concentrazione selezionata era basata sulla concentrazione tipica utilizzata per l'anticorpo neutralizzante IL-17 (Ab17), normalmente testato a 750 ng/ml. Considerando che in questa fase non era possibile conoscere la concentrazione dei

surnatanti perché nei surnatanti di coltura erano presenti altre proteine (come le proteine del siero), per valutare la potenziale concentrazione di cloni è stata eseguita una determinazione delle proteine sui surnatanti dei cloni. Poiché si trattava solo di una concentrazione potenziale, abbiamo deciso di testare i cloni alla concentrazione di riferimento utilizzata per Ab17 (750 ng/ml) e alle concentrazioni 10 volte più piccola (75 ng/ml) e 10 volte più grande (7500 ng/ml).

I nostri risultati hanno mostrato che, in modo quasi comparabile, tutti e tre i cloni avevano la capacità di ripristinare il rilascio di IL-6 alla dose più elevata (7500 ng/ml), mentre solo il clone #12 riesce a ridurre significativamente il rilascio di citochine già a una concentrazione inferiore (750 ng/ml, paragonabile a quella di Ab17).

A 75 ng/ml i cloni non sono stati in grado di invertire l'effetto indotto dalla somministrazione del peptide FM-0410 (Figura 8).

Sulla base dei risultati ottenuti, la produzione di anticorpi è stata portata avanti a partire dal Clone #12.

Metodi: Il processo di produzione di anticorpi monoclonali comporta più fasi:

Fase I: Sintesi del peptide FM-0410 (Ac-LEKILVSVGATAVTPIVHHVAC) (SEQ ID NO:1);

Fase II: Immunizzazione di 5 topi con peptide utilizzando un protocollo ottimizzato di 51-79 giorni (4-6 iniezioni fino a una risposta immunitaria ottimale) e controllo della risposta immunitaria come test ematologici e titoli (ELISA contro il peptide);

Fase III: Fusione di cellule della milza del topo migliore con una linea cellulare di mieloma di topo, coltura di ibridomi in terreno selettivo, screening di selezione allo stadio policlonale di ibridomi specifici contro il peptide in ELISA (circa 10x96 pozzetti) e spedizione dei migliori campioni di surnatanti cloni per i nostri test;

Fase IV: Sub-clonazione dei migliori 2 cloni parentali, 2-3 cicli di diluizioni limitanti e screening contro il peptide in ELISA, determinazione isotipica e crioconservazione delle cellule con preparazione di fiale dal miglior clone finale;

Fase V: Produzione del miglior clone finale, purificazione mediante ProteinA/G (PBS pH 7.5, privo di azidi, sterilizzato mediante filtrazione su membrana) e QC mediante

SDS-PAGE più ELISA. La Tabella 1 riassume il protocollo di immunizzazione. Lo sviluppo dell'anticorpo monoclonale è stato effettuato da ProteoGenix SAS e i risultati dei cloni si riferiscono a surnatanti inviati dall'azienda dopo la fase III e dopo la 5a immunizzazione.

5

Tabella 1: Sommario del Protocollo di Immunizzazione

Giorno (D)	
1	1 ^a Immunizzazione
14	2 ^a Immunizzazione
28	3 ^a Immunizzazione
35	Saggio ELISA
42	4 ^a Immunizzazione
49	Saggio ELISA
51	Fusione se boost finale al D42
56	5 ^a Immunizzazione
63	Saggio ELISA
65	Fusione se boost finale al D56
70	6 ^a Immunizzazione
77	Saggio ELISA
79	Fusione se boost finale al D70

Esempio 6: FM-0410 ha una marcata attività chemiotattica

IL-17 (10-500 ng/ml) e, ancora di più, FM-0410 hanno mostrato un effetto chemiotattico

dipendente dalla concentrazione rispetto al Gruppo di Controllo (Ctrl) come mostrato nella Figura 9. In particolare, queste attività erano quasi simili al controllo positivo fmlp (10^{-6} M) quando entrambe le proteine sono state testate a una concentrazione di 500 ng/ml.

5 **Metodi:**

Cellule endoteliali dermiche del sangue umane (HDBEC): Cellule endoteliali dermiche del sangue umane primarie (HDBECs) sono state acquistate da PromoCell e coltivate nel terreno di crescita per cellule endoteliali MV raccomandato dal produttore (PromoCell, Heidelberg, Germany). Le HDBEC sono state seminate in piastre di coltura tissutale da 12 pozzetti dopo 4 passaggi a una densità di semina che produce monostrati confluenti. I monostrati HDBEC sono stati lavati in terreno di crescita delle cellule endoteliali MV riscaldato a 37°C e stimolati con IL-17 o FM-0410 (100 ng/ml) da soli o in combinazione con TNF- α (100 U/ml) per 24 h a 37°C. Le cellule sono state stimulate per 24 h, prima della colorazione con IL-17Rs (RA o RC) o recettori di adesione ICAM/VCAM utilizzando un test di citometria a flusso. I surnatanti sono stati raccolti e misurati per valutare i livelli di IL-6 o TNF- α .

Isolamento dei neutrofili: Il sangue è stato prelevato secondo l'approvazione del comitato etico di ricerca locale (QMERC2014/61). Il consenso informato è stato fornito secondo la Dichiarazione di Helsinki. Tutti i campioni di sangue sono stati raccolti il giorno degli esperimenti da donatori sani e utilizzati immediatamente. Ogni condizione ha 3 replicati biologici (3 diversi donatori). I neutrofili sono stati isolati utilizzando un gradiente Histopaque a doppia densità e una lisi ipotonica come descritto in precedenza.

Saggio di chemiotassi Transwell: La chemiotassi è stata valutata impiegando un saggio Transwell. IL-17 (10-500 ng/ml), FM-0410 (10-500 ng/ml) or N-formilmetionina-leucil-fenilalanina come controllo positivo (fmlp; 10^{-6} M) (volume finale 700 μ l) in terreno M199 sono stati aggiunti al pozzetto inferiore del supporto permeabile Transwell-24 con pori di 3.0 μ m (Corning, NY, USA). 2×10^5 neutrofili in un volume finale di 200 μ l sono stati aggiunti alla camera superiore che aveva un monostrato di HDBEC

confluente attivato con TNF- α (100U/ml) e IFN- γ (10 ng/ml) per 24 ore. Dopo 2 ore a 37°C, i neutrofili sono stati raccolti dai pozzetti inferiori e quantificati mediante citometria a flusso utilizzando CountBright™ Absolute Counting Beads (Thermofisher, Rugby, UK) come descritto in precedenza.

5

Esempio 7: Il trattamento FM-0410 promuove l'adesione e la tras migrazione endoteliale

La co-stimolazione delle cellule endoteliali con IL-17 (100 ng/ml) o con peptide derivato da IL-17 a lunghezza intera (FM-0410, 100 ng/ml) in combinazione con TNF- α (100 U/ml) induce la sovraregolazione di entrambe le espressioni di VCAM e ICAM (Figura 10 CD). Non sono stati osservati effetti per entrambi i recettori IL-17RA e RC (Figura 10 A-B). Per testare l'effetto del peptide FM-0410 (derivato da IL-17) in un saggio di adesione statica, le hPBMC sono state co-coltivate con monostrati HDBEC stimolati da citochine. I nostri risultati hanno mostrato che il co-trattamento con IL-17 o, ancora di più, FM-0410 (più TNF- α) ha causato un aumento significativo (Figura 2E) in termini di numero totale di hPBMC adese e tras migrate (Figura 10 F-G). Successivamente, i livelli di IL-6 sono stati monitorati come marker di attivazione cellulare e i nostri risultati hanno rivelato una sovraregolazione di questa citochina dopo la co-stimolazione con il peptide (Figura 10 H).

20 Metodi:

Citometria a flusso: HDBEC, raccolte dopo 24 h di trattamento, sono state lavate con PBS senza Ca²⁺ e Mg²⁺ contenente lattosio 25 mM per 20 minuti a temperatura ambiente con miscelazione occasionale. Le cellule sono state, quindi, incubate con agenti bloccanti FcR (Miltenyi) in PBS, senza Ca²⁺ e Mg²⁺ contenente lattosio, prima di colorare le cellule con anticorpi IL-17 Recettore A (1:100; clone 133617) e IL-17 Recettore C (1:100; clone 309822). Inoltre, le cellule HDBEC sono state anche colorate con ICAM (BBIG-V3; 1:50, APC, BD Biosciences) e VCAM (3E2; 1:50, FITC, BD Biosciences). L'espressione proteica è stata analizzata mediante citometria a flusso su un Dako CyAn (Beckman Coulter, High Wycombe, Regno Unito) e i dati sono stati

analizzati utilizzando il funzionamento del software MRFlow e FlowJo. Il legame non specifico degli anticorpi è stato quantificato utilizzando i controlli isotipici corrispondenti.

Saggio Elisa: I livelli di IL-6 a 24 h sono stati misurati utilizzando kit di saggio

- 5 immunoassorbente legato a un enzima disponibili in commercio (kit ELISA, R&D System, Milano, Italia) secondo le istruzioni del produttore. In breve, 100 µl di surnatanti, standard diluiti, controlli di qualità e tampone di diluizione (bianco) sono stati applicati su una piastra con l'anticorpo monoclonale per 2 h. Dopo il lavaggio, sono stati aggiunti 100 µl di anticorpo marcato con biotina e l'incubazione è continuata per
- 10 1 h. La piastra è stata lavata e sono stati aggiunti 100 µl di coniugato streptavidina-HRP e la piastra è stata incubata per un ulteriore periodo di 30 minuti al buio. L'aggiunta di 100 µl di substrato e di soluzione di arresto ha rappresentato gli ultimi passaggi prima della lettura dell'assorbanza (misurata a 450 nm) su un lettore di micropiastre. I livelli di antigene nei campioni sono stati determinati utilizzando una
- 15 curva standard ed espressi come pg/ml.

Cellule mononucleate di sangue periferico umano (hPBMC): Il sangue è stato raccolto da donatori sani con consenso informato scritto e verbale e l'approvazione del University of Birmingham Local Ethical Review Committee (ERN_18-0382). Le cellule mononucleate di sangue periferico umano (hPBMC) sono state isolate come descritto

20 in precedenza (Riedhammer et al 2016).

Saggio di migrazione transendoteliale di PBMC umane: prima di iniziare il saggio, i monostrati HDBEC sono stati lavati con terreno 199 (Thermo Fisher Scientific) a 37°C integrato con BSA allo 0.15% p/v (MilliporeSigma) per rimuovere eventuali citochine residue. Le hPBMC (1×10^6) sono state co-coltivate con monostrati HDBEC stimolati

25 con citochine a 37°C per 20 minuti. Per rimuovere eventuali cellule aderenti mediante interazioni elettrostatiche, i monostrati sono stati lavati due volte con terreno 199 a 37°C integrato con BSA allo 0.15% p/v. I monostrati HDBEC e le hPBMC aderenti sono stati quindi fissati in glutaraldeide al 2% (MilliporeSigma) per 15 minuti e lavati due volte in PBS. L'entità dell'adesione e della tras migrazione delle hPBMC è stata rilevata

utilizzando la microscopia a contrasto di fase con un microscopio a campo luminoso invertito (IX71; Olympus, Tokyo, Giappone) ad un ingrandimento $\times 20$. È stato acquisito un totale di 5 immagini di 5 viste diverse per pozzetto e sono state elaborate offline utilizzando il software Image Pro 7 (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Le hPBMC sono state contrassegnate manualmente come aderenti alla superficie (fase luminosa e arrotondata) o come trasmigrate (fase scura con morfologia alterata). Per ciascun pozzetto sono state calcolate l'adesione totale delle hPBMC e la percentuale media di trasmigrazione.

Saggio di assenza di endotossine: Le soluzioni somministrate sono state confermate come prive di endotossine mediante un kit di prova commerciale per il dosaggio del lisato di limulus polifemo (< 0.01 EU/10 mg).

Analisi statistica: L'analisi statistica è stata eseguita con Graph-Pad Prism (Graph-Pad Software 8.0). Tutti i dati sono presentati come medie $\pm$ S.D. e sono stati analizzati utilizzando l'analisi ANOVA a una o due vie seguita da quella di Bonferroni per test di confronti multipli (più di due gruppi). Le differenze tra le medie sono state considerate statisticamente significative quando è stato raggiunto $P \leq 0.05$. La dimensione del campione è stata scelta per garantire alfa 0.05 e potenza 0.8.

Esempio 8: Sequenze di anticorpi monoclonali neutralizzanti

Lo sviluppo dell'anticorpo monoclonale condotto come descritto nell'Esempio 5 ha permesso di ottenere l'anticorpo neutralizzante dell'invenzione (qui indicato come Ab17-IPL-1).

È stato effettuato il sequenziamento della Catena Pesante a lunghezza intera (HC) e della Catena Leggera (LC) a lunghezza intera dell'anticorpo della linea cellulare di ibridoma murino. L'anticorpo anti-interleuchina-17A, ha una Catena Pesante (HC) avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO: 3 e una Catena Leggera (LC) avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO: 5. 6 regioni CDR, dette CDR essendo:

- a. una HC-CDR1 avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO: 6;
- b. una HC-CDR2 avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO: 7;

- c. una HC-CDR3 avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO:8;
- d. una LC-CDR1 avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO:9;
- e. una LC-CDR2 avente la sequenza aminoacidica di STS (Ser-Thr-Ser); e
- f. una LC-CDR3 avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO:10.

5 **Metodi:**

L'RNA totale è stato estratto dalle cellule di ibridoma ed è stato successivamente sintetizzato il cDNA. I geni degli anticorpi sono stati quindi amplificati mediante PCR isotipo-specifica, subclonati separatamente in un vettore di clonazione standard e sequenziati. La struttura primaria del cDNA codificante l'anticorpo è illustrata nella

10 Figura 1.

L'RNA totale è stato estratto da cellule di ibridoma in coltura (TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit), il cDNA è stato quindi sintetizzato mediante trascrizione inversa utilizzando primer oligo-dT (Kit PrimeScript RT Reagent Kit con gDNA Eraser e TA-cloning Kit (Takara)) e le HC (Catena Pesante) e LC (Catena Leggera) sono state

15 infine amplificate mediante PCR (sequenziatore PacBio RS II).

È stato possibile osservare le HC e LC, rispettivamente amplificate mediante primer degenerati IgG e primer specifici Kappa, mediante elettroforesi su gel (Figura 12), confermando che l'isotipo è IgGKappa. I prodotti della PCR sono stati quindi subclonati in un vettore standard, a cui è seguita la trasformazione batterica, quindi la raccolta

20 delle colonie e la validazione mediante PCR (Figura 13) e infine il sequenziamento di 7/8 cloni positivi per ciascuna catena.

Esempio 9: Uso dell'anticorpo monoclonale neutralizzante dell'invenzione (Ab17-IPL-1) per il trattamento di malattie a base infiammatoria e autoimmuni (per esempio artrite reumatoide e psoriasi)

25

Isolamento di fibroblasti umani: Campioni di tessuto sinoviale sono stati ottenuti mediante biopsia ecoguidata da pazienti naïve al trattamento con una nuova insorgenza di artrite clinicamente evidente e una durata dei sintomi di ≤ 12 settimane, che al follow-up presentavano un'artrite in risoluzione (Res). I pazienti sono stati

classificati come affetti da artrite in via di risoluzione se non vi era evidenza clinica di gonfiore sinoviale in qualsiasi articolazione periferica (su un conteggio delle articolazioni gonfie di 66 articolazioni) all'esame finale almeno 1 anno dopo la presentazione iniziale, in assenza di farmaci antireumatici modificanti la malattia (DMARD) o terapia con glucocorticoidi per almeno i 3 mesi precedenti. Inoltre, sono stati raccolti campioni di tessuto sinoviale da soggetti con artrite reumatoide (AR) accertata. L'AR è stata classificata secondo i criteri dell'American College of Rheumatology del 2010. Prima della biopsia, l'entità della sinovite in scala di grigi e il potenziamento del power Doppler all'interno della sinovia dell'articolazione sottoposta a biopsia sono stati sistematicamente classificati utilizzando una scala da 0 a 3. I fibroblasti sono stati isolati come descritto in precedenza (Filer et al., 2011) e utilizzati tra i passaggi 4 e 65. I monostrati di fibroblasti sono stati stimolati con IL-17 (10 ng/ml) e TNF- α (100 U/ml) da soli o in combinazione (30 minuti prima) con un anticorpo monoclonale neutralizzante IL-17Ab commerciale (MAB421) o con l'anticorpo dell'invenzione Ab17-IPL-1 alla concentrazione di 10 μ g/ml per 24 h a 37°C. I surnatanti sono stati raccolti e misurati per valutare i livelli di IL-6.

Tutti i campioni umani sono stati ottenuti con il consenso scritto e informato e l'approvazione di Human Biomaterial Resource Center Human Biomaterial Resource Centre (Birmingham, UK), West Midlands and Black Country Research Ethics Committee, North East Tyne and West South Research Ethics Committee, o University of Birmingham Local Ethical Review Committee in conformità con la Dichiarazione di Helsinki.

Saggio Elisa: I livelli di IL-6 sono stati misurati utilizzando kit di saggio immunoassorbente legato a un enzima disponibili in commercio (kit ELISA, R&D System, Milano, Italia) secondo le istruzioni del produttore. In breve, 100 μ l di surnatanti, standard diluiti, controlli di qualità e tampone di diluizione (bianco) sono stati applicati su una piastra con l'anticorpo monoclonale per 2 h. Dopo il lavaggio, sono stati aggiunti 100 μ l di anticorpo marcato con biotina per 1 h. La piastra è stata lavata e 100 μ l del coniugato streptavidina-HRP sono stati incubati per un ulteriore periodo di

30 minuti al buio. L'aggiunta di 100 µl di substrato e di soluzione di arresto ha rappresentato gli ultimi passaggi prima della lettura dell'assorbanza (misurata a 450 nm) su un lettore di micropiastre. I livelli di antigene nei campioni sono stati determinati utilizzando una curva standard espressa come pg/ml.

- 5 Saggio di assenza di endotossine: Le soluzioni somministrate sono state confermate come prive di endotossine mediante un kit di prova commerciale per il dosaggio del lisato di limulus polifemo (< 0.01 EU/10 mg).

- Analisi statistica: L'analisi statistica è stata eseguita con Graph-Pad Prism (Graph-Pad Software 8.0). I dati multivarianti sono stati analizzati utilizzando l'analisi della varianza
10 con il post-test di Bonferroni o il test di Kruskal-Wallis con il post-test di Dunn. $p < 0.05$ è stato considerato come statisticamente significativo.

Risultati:

I dati ottenuti hanno consentito di concludere che l'anticorpo dell'invenzione (Ab17-IPL-1) migliora l'attivazione dei fibroblasti dell'artrite reumatoide umana (RA):

- 15 La stimolazione dei fibroblasti da entrambe le condizioni Res e RA con una combinazione di IL-17 (10 ng/ml) e TNF- α (100 U/ml) ha indotto il rilascio di IL-6 (valori medi: 2795.27 pg/ml per Res e 3662.05 pg/ml per RA).

- In particolare, in presenza di Ab17-IPL-1 abbiamo osservato una significativa riduzione della produzione di IL-6 (2383.61 pg/ml) in un andamento simile rispetto all'anticorpo
20 MAB421 (2316.19 pg/ml). Non sono stati osservati effetti significativi per entrambi gli anticorpi neutralizzanti in condizioni Res (Figura 11).

Dalla descrizione che precede e dagli Esempi sopra citati, risultano evidenti i vantaggi raggiunti dal prodotto descritto ed ottenuto secondo la presente invenzione.

RIVENDICAZIONI

1. Un anticorpo isolato anti-interleuchina-17A, in cui detto anticorpo comprende:
- 5 a. una Catena Pesante (HC) avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO: 3;
 e
 b. una Catena Leggera (LC) avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO: 5.
2. L'anticorpo isolato anti-interleuchina-17A della rivendicazione 1, in cui detto anticorpo comprende 6 regioni CDR, dette regioni CDR essendo:
- 10 a. una HC-CDR1 avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO: 6;
 b. una HC-CDR2 avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO:7;
 c. una HC-CDR3 avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO:8;
 d. una LC-CDR1 avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO:9;
 e. una LC-CDR2 avente la sequenza aminoacidica di STS (Ser-Thr-Ser); e
15 f. una LC-CDR3 avente la sequenza aminoacidica di SEQ ID NO:10.
3. L'anticorpo isolato anti-interleuchina-17A di una qualsiasi delle rivendicazioni 1 o 2, in cui detto anticorpo è un anticorpo monoclonale, un anticorpo chimerico e/o è umanizzato o umano.
- 20
4. L'anticorpo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui detto anticorpo si lega al peptide di SEQ ID NO:1.
5. Un polinucleotide codificante l'anticorpo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4.
- 25
6. Un vettore comprendente il polinucleotide della rivendicazione 5, in cui il vettore è opzionalmente un vettore di espressione.

7. Una cellula ospite comprendente il vettore della rivendicazione 6, in cui detta cellula ospite è procariote, eucariote o di mammifero.

5 8. Una composizione farmaceutica comprendente (i) l'anticorpo anti-interleuchina-17A di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4 o (ii) il polinucleotide della rivendicazione 5, in cui la composizione opzionalmente comprende inoltre carrier e/o eccipienti farmaceuticamente accettabili.

10 9. Un anticorpo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4 o una composizione farmaceutica della rivendicazione 8, per l'uso come medicamento.

15 10. Un anticorpo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4 o una composizione farmaceutica della rivendicazione 8, per l'uso nel trattamento della psoriasi, dell'artrite psoriasica (PsA), dell'artrite reumatoide (RA) e della spondilite anchilosante (AS).

11. Uso del peptide di SEQ ID NO:1, per l'identificazione di composti anti-interleuchina-17.

20

Figure 1



Figure 2

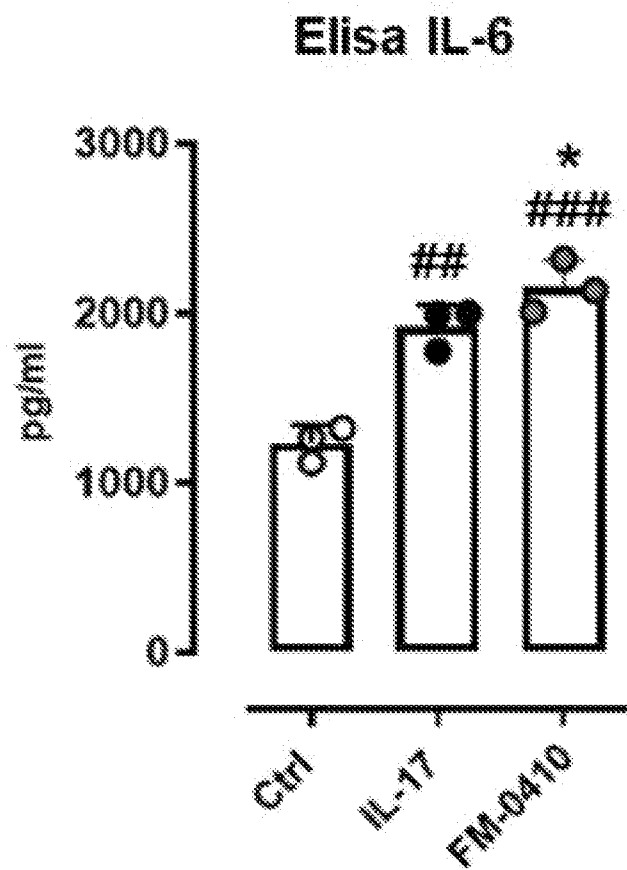


Figure 3

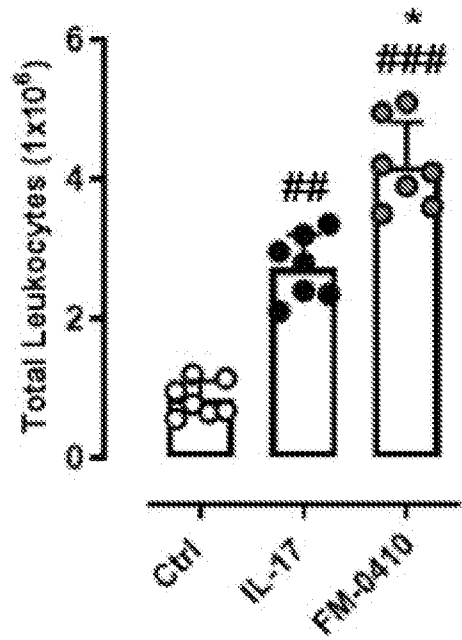


Figure 4

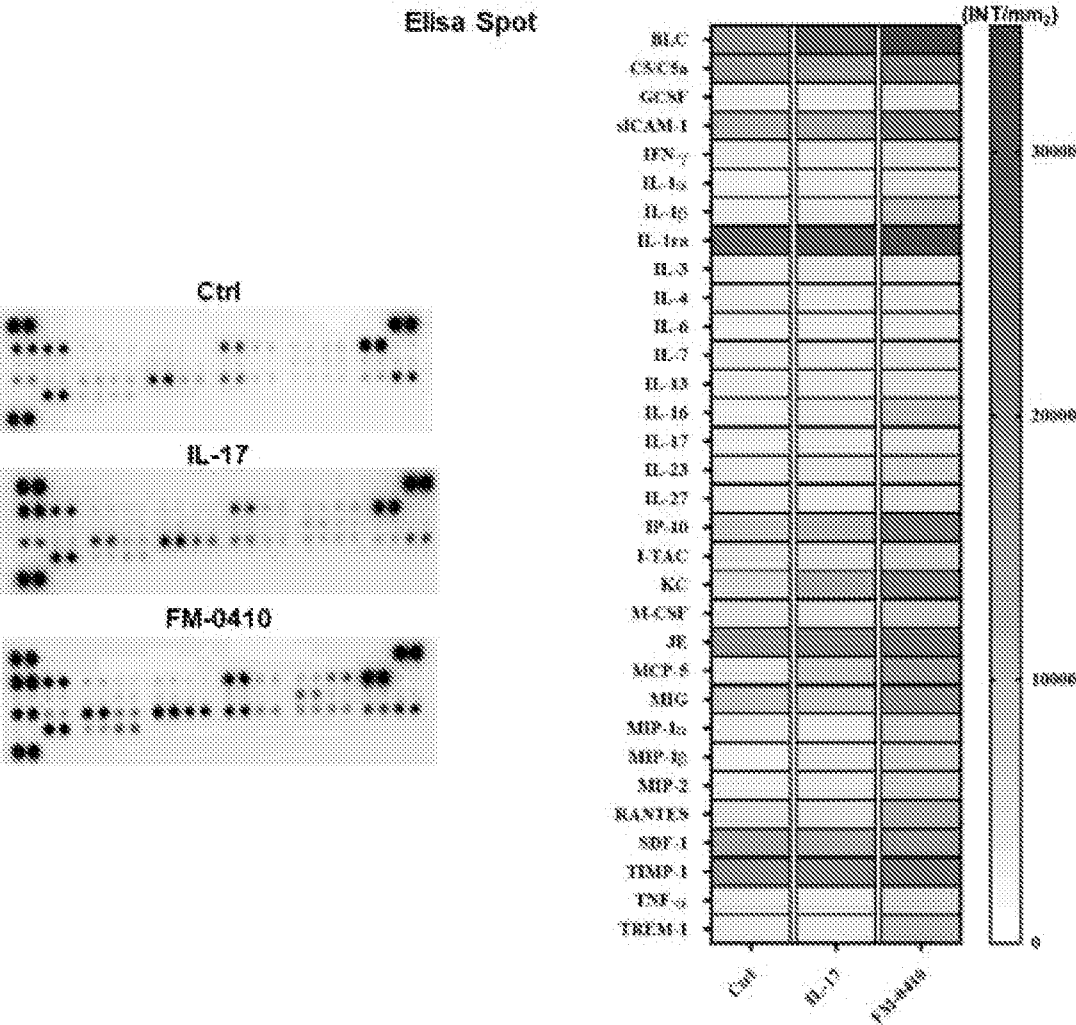


Figure 5

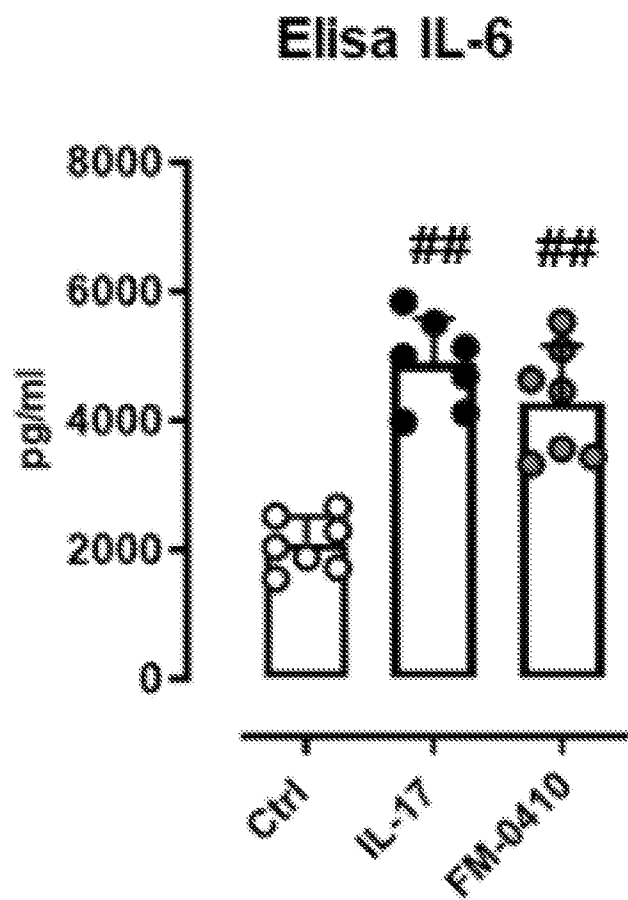


Figure 6

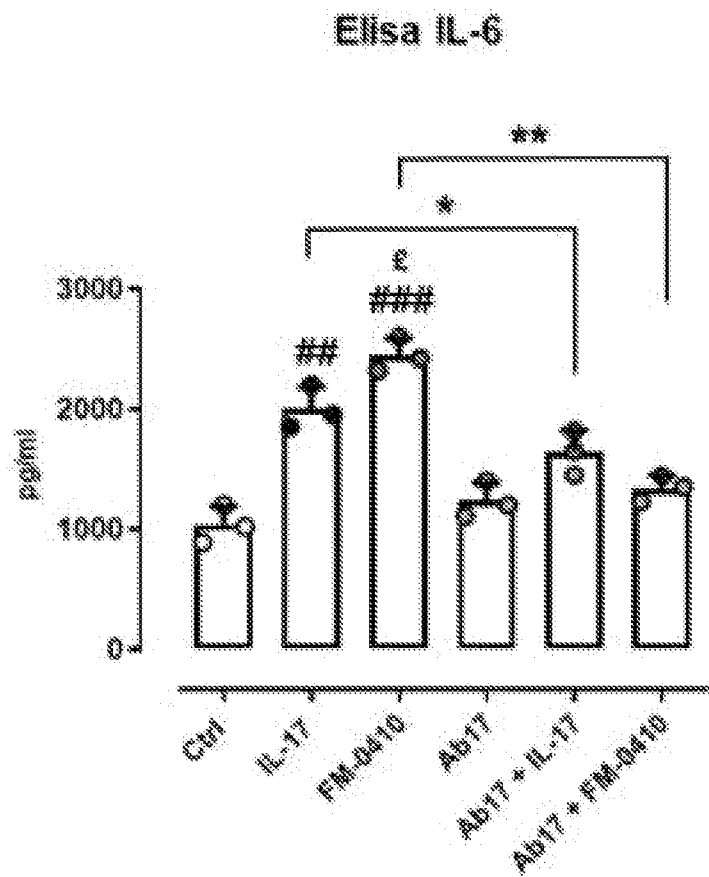


Figure 7

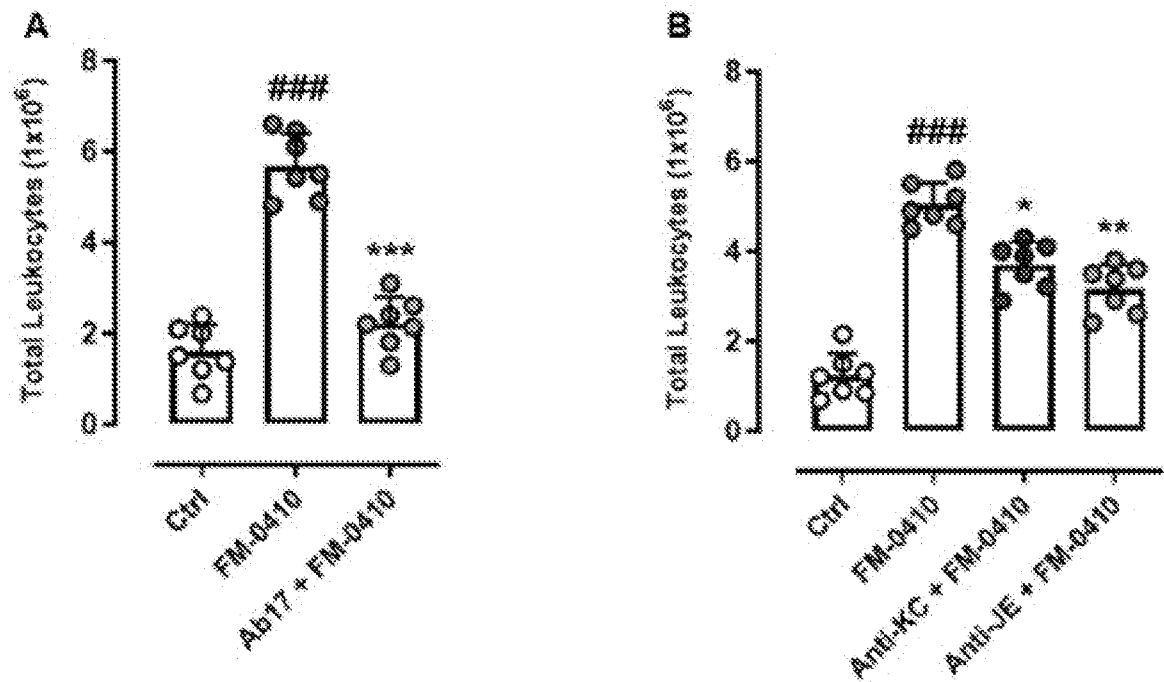


Figure 8

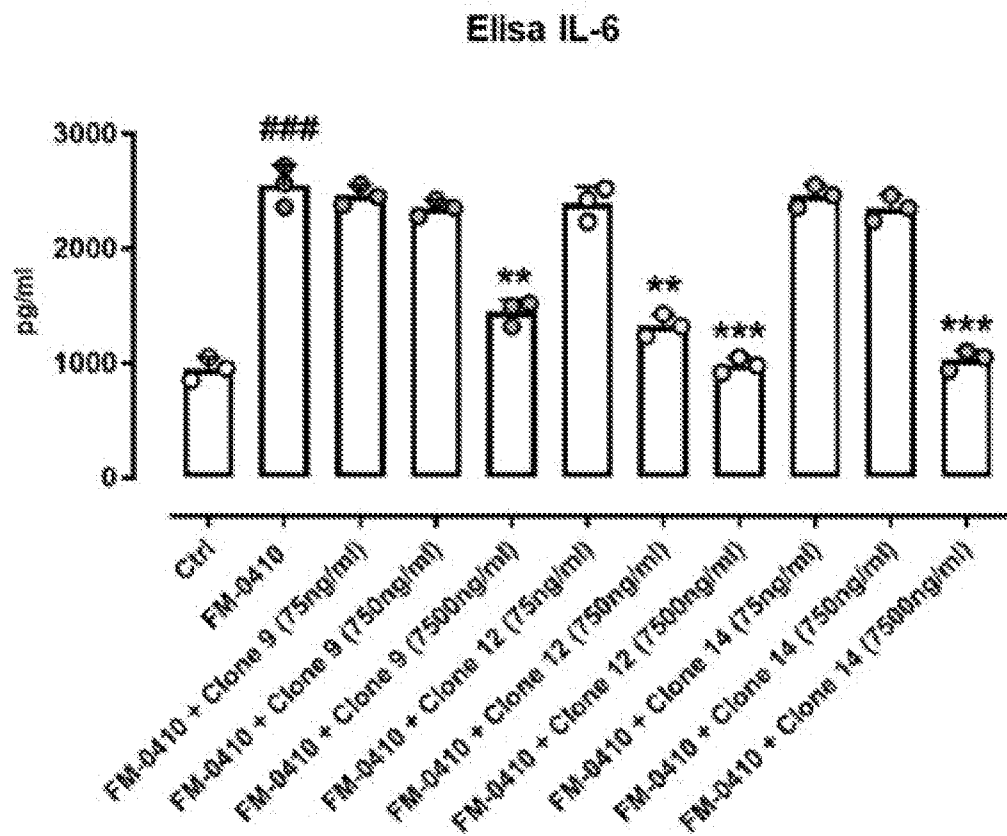


Figure 9

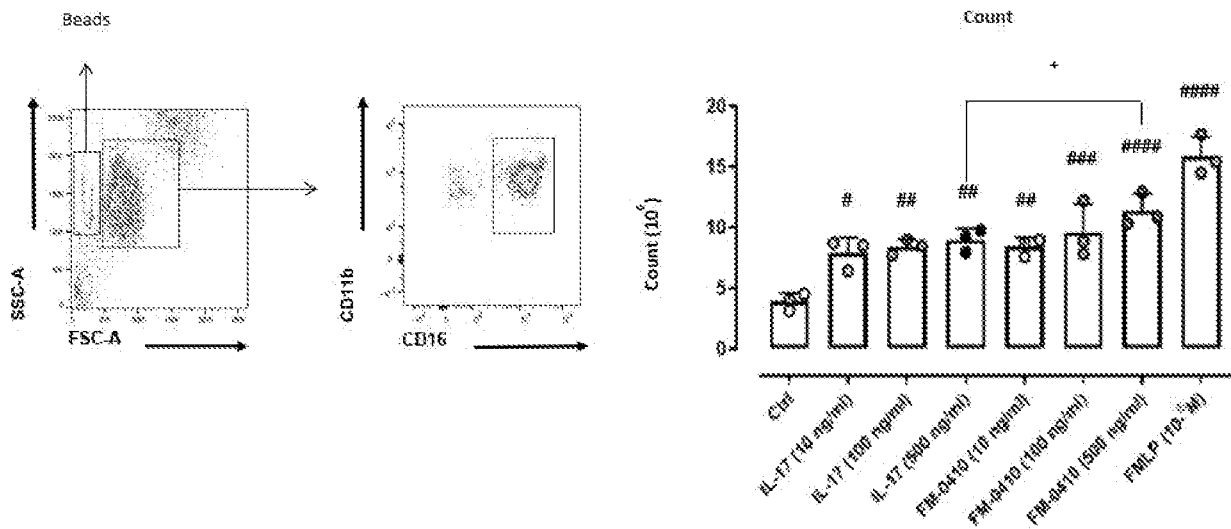


Figure 10

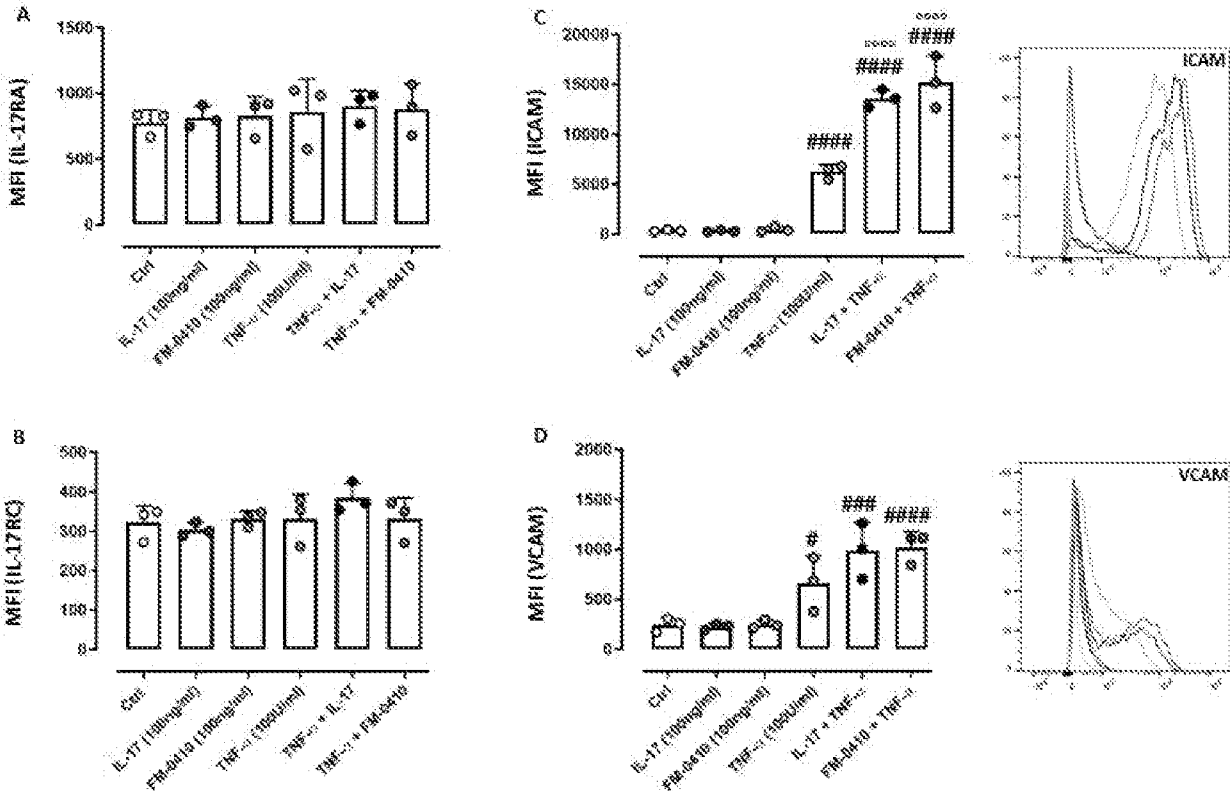


Figure 10 (cont.)

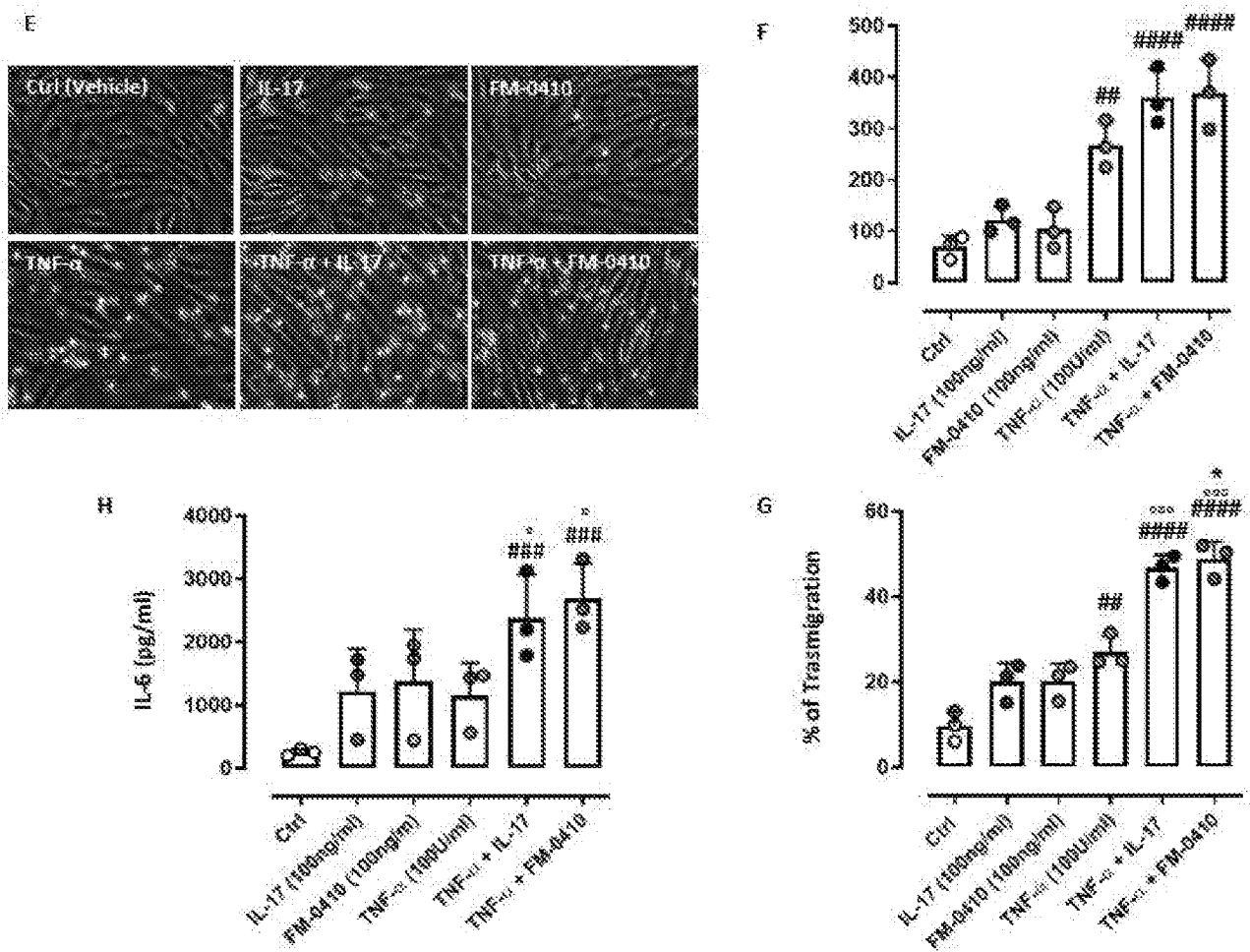


Figure 11

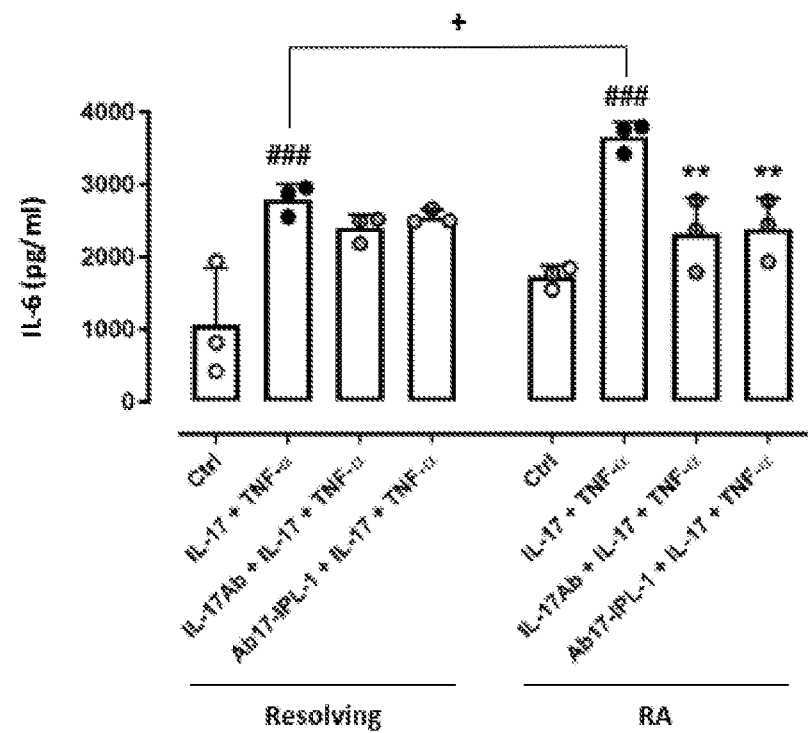


Figure 12

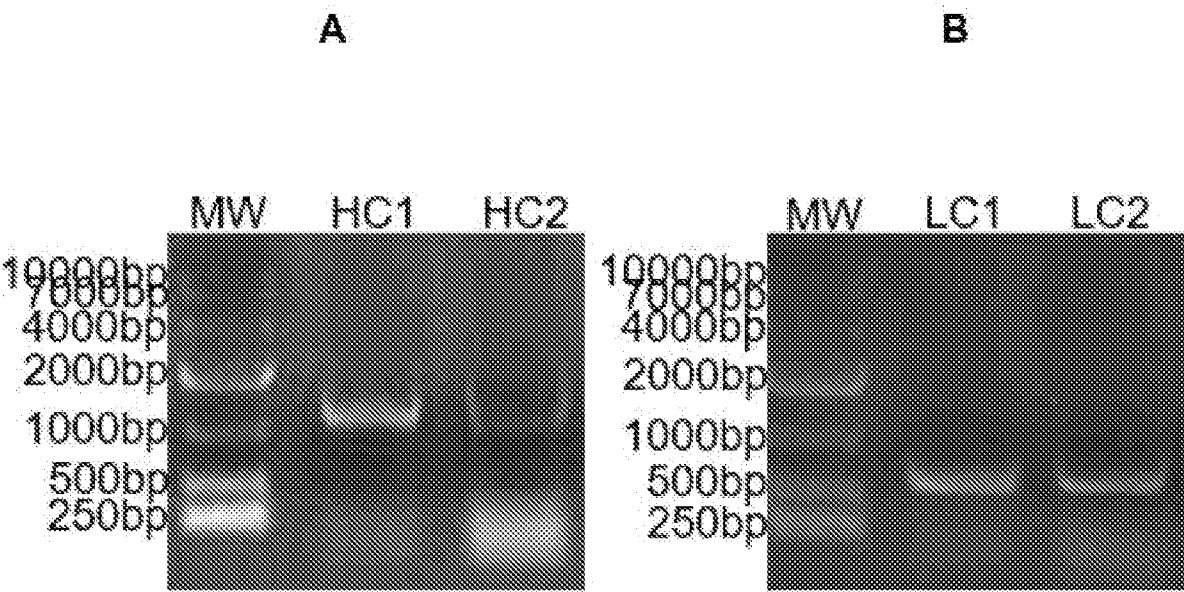


Figure 13

