

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 023 709**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2016** **PCT/GB2016/050070**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2016** **WO16113557**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2016** **E 16700518 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2025** **EP 3247724**

54 Título: **Proteínas de unión a IL-17A**

30 Prioridad:

12.01.2015 GB 201500463

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.06.2025

73 Titular/es:

CRESCENDO BIOLOGICS LIMITED (100.00%)
50/60 Station Road, c/o We Work
Cambridge CB1 2JH, GB

72 Inventor/es:

EDWARDS, BRYAN;
LASHMAR, ULLA;
MCGUINNESS, BRIAN;
ROMANOS, MIKE;
SANDAL, THOMAS y
TENG, YUMIN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 3 023 709 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

Proteínas de unión a IL-17A

5 Campo de la invención

La invención se refiere a moléculas de unión a IL-17A y al uso de tal molécula de unión en el tratamiento de una enfermedad.

10 Introducción

La psoriasis es una enfermedad de la piel inflamatoria recidivante y remitente crónica que afecta al 2-3% de la población del mundo (~125 m de pacientes) que provoca una morbilidad significativa y una calidad de vida disminuida, en gran medida debido a brotes clínicos y lesiones desfigurantes en áreas visibles de la piel, manifestaciones sistémicas y efectos secundarios relacionados con los fármacos. La forma común de la enfermedad, denominada "psoriasis vulgar en placas", se observa en más del 80% de los pacientes y está caracterizada por placas escamosas eritematosas (normalmente en los codos, las rodillas, el cuero cabelludo y las nalgas) que pueden variar en tamaño desde uno mínimo hasta la afectación de toda la superficie de la piel.

Dependiendo del grado de afectación del área de superficie corporal (BSA), la psoriasis puede categorizarse en enfermedad leve (<3% de afectación del BSA), moderada (3-10% del BSA) y grave (>10% del BSA). Agentes tópicos tales como los corticosteroides, los derivados de vitamina D, el alquitrán de hulla y los retinoides tópicos son la piedra angular de la gestión inicial de la psoriasis y son una parte importante de la escalera de tratamiento aplicada a los pacientes por todo el espectro de gravedad de la enfermedad. A los pacientes diagnosticados con enfermedad de leve a moderada se les prescriben normalmente agentes tópicos como monoterapia. A los pacientes con enfermedad grave se les prescriben normalmente agentes tópicos como complemento a fototerapia o terapias sistémicas (de moléculas pequeñas) tales como metotrexato, ciclosporina o retinoides orales. El régimen de tratamiento para la psoriasis de moderada a grave incluye también terapias basadas en anticuerpos.

Los productos terapéuticos actualmente en el mercado para el tratamiento de la psoriasis ofrecen grados variables de alivio sintomático y tasas de recidiva reducidas, pero ninguno se considera actualmente curativo y por tanto requieren administración crónica. Aunque muchos agentes tópicos preexistentes pueden ser efectivos durante cortos periodos de tiempo, debido a la toxicidad limitante del tratamiento la mayoría están restringidos a un uso a corto plazo. Esto significa que los pacientes necesitan una monitorización rutinaria de los efectos secundarios y un paso en ciclos regular a nuevos protocolos de tratamiento.

A los pacientes con enfermedad grave se les prescriben normalmente agentes tópicos como complemento a fototerapia o terapias sistémicas (de moléculas pequeñas) tales como metotrexato, ciclosporina o retinoides orales (Nast *et al.*, Arch Dermatol Res (2007) 299:111-138). La fototerapia puede ser efectiva, pero es inconveniente y está asociada con un riesgo significativo de cáncer de piel. Las terapias sistémicas de moléculas pequeñas están asociadas con un riesgo cardiovascular aumentado; disfunción renal, leucopenia y trombocitopenia. Por ejemplo, el metotrexato puede provocar una neutropenia y daño hepático y está contraindicado para hombres y mujeres en edad reproductiva sin la debida precaución. La ciclosporina es un potente inmunosupresor, que tiene efectos adversos potenciales sobre los riñones y la presión arterial. La acitretina es un retinoide oral que tiene una grama de efectos secundarios, y también está contraindicada para mujeres en edad reproductiva sin la debida precaución (Nast *et al.*, Arch Dermatol Res (2007) 299:111-138).

El régimen de tratamiento para la psoriasis de moderada a grave incluye también terapias basadas en anticuerpos. Los tratamientos aprobados incluyen adalimumab (Humira®), un anticuerpo monoclonal humanizado con actividad contra TNF-alfa(α), el inhibidor de TNF-α etanercept (Enbrel®), el inhibidor de TNF-α infliximab (Remicade®) y más recientemente ustekinumab (Stelara®), un Acm humano que selecciona como diana la subunidad p40 común de IL12 e IL23, bloqueando de ese modo la señalización de ambas citocinas.

La interleucina-17A (IL-17A) es una citocina proinflamatoria producida por células T activadas, particularmente células Th17. Los niveles altos de esta citocina están asociados con un número de enfermedades inflamatorias crónicas. Los anticuerpos que se unen a IL-17A para modular su actividad en trastornos inflamatorios y autoinmunes se han propuesto para una variedad de estados, particularmente la artritis reumatoide (tal como se describe en los documentos WO 2007/149032, WO 2010/102251, WO 2008/021156, WO 2012/156219 y Katrien *et al.*, Arthritis and Rheumatism. 2013; 65:S543). Otras proteínas de unión al dominio variable duales multiespecíficas que IL-17 y TNF se han propuesto para tratar estados inflamatorios crónicos incluyendo la psoriasis (documento WO 2013/063110).

En los últimos años, la importancia de la ruta de Th17 se ha validado ampliamente en la psoriasis y varios anticuerpos monoclonales (Acm) que seleccionan como diana IL17 han mostrado la importancia significativa de modular estas citocinas e influir en la psoriasis. IL-17 es una diana para la terapia tópica en la piel. Aunque la psoriasis puede tener un componente sistémico en algunos pacientes, la enfermedad es principalmente de la piel. La IL-17 secretada por las células Th17 actúa sobre los queratinocitos epidérmicos, por medio de complejos de IL-17R presentes en estas

células, para iniciar un bucle de realimentación de hiperproliferación de queratinocitos y una inflamación en curso, generando de ese modo la placa psoriásica. Se cree que el elemento principal de la actividad patológica está localmente en la piel, y por tanto la inhibición de la interacción IL-17/IL-17R es la diana mejor validada para la terapia tópica. Esto está en contraste con otras dianas de Th17 validadas, tal como IL-23, en la que una fase significativa de la actividad está en los ganglios linfáticos regionales.

Se ha mostrado que varios de otros agentes de anticuerpos monoclonales en desarrollo reducen notablemente la gravedad de la enfermedad en pacientes con psoriasis en placas de moderada a grave. Estos agentes incluyen ixekizumab (Eli Lilly) y secukinumab (Novartis), ambos de los cuales selecciona como diana IL-17A, y brodalumab (Amgen) que se une a e inhibe la señalización de IL-17RA y por tanto se esperaría que bloquease los miembros de la familia de IL-17 que utilicen este receptor, incluyendo IL-17A, IL-17F, IL-17A/F y posiblemente IL-17E. Los resultados clínicos preliminares para los inhibidores de IL-17 indican la importancia de IL-17A en la fisiopatología de la psoriasis. En programas de ensayos clínicos independientes hasta y que incluyen ensayos de fase III de confirmación sustanciales, se ha notificado que los tres agentes reducen la gravedad de la enfermedad notablemente en pacientes con psoriasis en placas de moderada a grave. Se ha mostrado que secukinumab regula por disminución las citocinas, las quimiocinas y las proteínas asociadas con las respuestas inflamatorias en piel lesionada. En resumen, la inhibición de IL-17A permite una intervención selectiva para abordar el sistema inmune desregulado en placa (Girolomoni *et al.*, The British Journal of Dermatology. 2012a; 167(4):717-724, Huebner *et al.*, Gut 2012; 61: 1693-700, Papp *et al.*, New Engl J Med 2012; 366: 1181-9, Mease *et al.*, N Engl J Med. 2014 12;370(24):2295-306 y Langley *et al.*, New Engl J Med 2014; 371: 326-38).

Los productos terapéuticos actualmente en el mercado para el tratamiento de la psoriasis ofrecen grados variables de alivio sintomático y tasas de recidiva reducidas, pero ninguno se considera actualmente curativo y por tanto se requiere administración crónica. Aunque muchos agentes tópicos preexistentes pueden ser efectivos durante cortos periodos de tiempo, debido a la toxicidad limitante del tratamiento la mayoría están restringidos a un uso a corto plazo. Esto significa que los pacientes necesitan una monitorización rutinaria de los efectos secundarios y un paso en ciclos regular a nuevos protocolos de tratamiento. La fototerapia puede ser efectiva, pero es inconveniente y está asociada con un riesgo significativo de cáncer de piel y muchas terapias sistémicas (de moléculas pequeñas) convencionales están asociadas con un riesgo cardiovascular aumentado; disfunción renal, leucopenia y trombocitopenia. Los agentes biológicos sistémicos han transformado el tratamiento de la psoriasis de moderada a grave, pero, como con cualquier régimen inmunosupresor, su uso crónico puede tener efectos secundarios significativos tal como un riesgo aumentado de infecciones o malignidades.

Ninguna de las intervenciones terapéuticas actuales son curativas, y por tanto todas requieren un uso crónico. Los regímenes terapéuticos tienen que tener en cuenta esto adoptando estrategias para reducir la toxicidad, incluyendo terapias rotativas o secuenciales, descanso farmacológico y terapia de combinación. De manera importante, para algunos fármacos hay un límite de tiempo de vida absoluto para la exposición que un paciente cualquiera puede recibir de manera segura.

Por tanto, hay una necesidad de nuevas opciones de terapia altamente efectivas y seguras para su uso tanto tópico como sistémico. En particular, hay por tanto una necesidad no satisfecha clara de nuevos fármacos tópicos con la eficacia de un agente biológico en pacientes con enfermedad grave, en los que una terapia de mantenimiento a largo plazo pueda mantener los síntomas bajo control tras el uso de Acm sistémico y por tanto mejore el perfil de seguridad para el uso crónico. De manera similar, aquellos pacientes que no se traten sistémicamente porque su enfermedad no es suficientemente grave se beneficiaría enormemente de la aplicación tópica de un fármaco con eficacia biológica.

Los anticuerpos han demostrado en sí mismos ser agentes terapéuticos extremadamente efectivos para tratar un gran número de diferentes indicaciones patológicas. En particular, ha habido una clara tendencia hacia el desarrollo de anticuerpos totalmente humanos para uso terapéutico entre las diversas alternativas. Debido a su tamaño y otras propiedades físicas, sin embargo, es actualmente el caso que los anticuerpos monoclonales tienen que administrarse o bien por vía intravenosa (iv) o bien por vía subcutánea (sc) y por tanto tienen una alta exposición sistémica. Por tanto, aunque los anticuerpos pueden ser altamente efectivos, su vía de administración puede ser a menudo inferior a la óptima, o bien dando como resultado una unión del anticuerpo al antígeno diana en ubicaciones no patológicas (comprometiendo potencialmente el funcionamiento sano de tejido no patológico, normal) o bien dando como resultado características de PK/PD inferiores a las óptimas. Cualquier desenlace puede dar como resultado una pérdida de eficacia y/o un perfil de seguridad comprometido en virtud de la vía de administración inferior a la óptima.

Debido a su tamaño y otras características biofísicas favorables, los fragmentos de anticuerpo son candidatos potencialmente atractivos para vías de administración alternativas. En particular, los fragmentos V_H son la porción más robusta, más pequeña, de una molécula de inmunoglobulina que conserva potencia y especificidad de diana. Por tanto, sería ventajoso administrar dominios V_H tópicamente a la piel, de modo que penetren en ubicaciones terapéuticamente beneficiosas dentro de la piel para tratar la enfermedad localmente. Cualquier V_H que pueda entrar en el torrente sanguíneo se aclarará rápidamente y por tanto tendrá poca o ninguna exposición sistémica, minimizando de ese modo la toxicidad sistémica relacionada con el mecanismo potencial.

La invención tiene como objetivo proporcionar una terapia segura y efectiva de estados asociados con la ruta de IL-17, en particular para el tratamiento tópico de la psoriasis.

- 5 Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento hace referencia a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para el diagnóstico).

Sumario de la invención

- 10 La invención se refiere a un anticuerpo de dominio variable de cadena pesada único de inmunoglobulina capaz de unirse a IL-17A humana, que comprende un dominio de inmunoglobulina variable de cadena pesada humana (VH) que comprende una secuencia de CDR1 que comprende SEQ ID NO. 5, una secuencia de CDR2 que comprende SEQ ID NO. 6 y una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO. 7, para su uso en el tratamiento de la psoriasis o la dermatitis atópica, administrándose el anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina tópicamente. La invención
15 está definida mediante las reivindicaciones adjuntas.

En una realización, dicho dominio VH comprende o consiste en SEQ ID NO. 8 o una secuencia con al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con SEQ ID NO. 8.

- 20 En una realización, la invención comprende una extensión C-terminal de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos de aminoácido.

En una realización, dicha extensión C-terminal es un residuo de alanina único.

- 25 En una realización, el anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina se obtiene o puede obtenerse a partir de un ratón que no produce ninguna cadena ligera o pesada endógena funcional.

En una realización, el anticuerpo se administra como composición farmacéutica.

- 30 En una realización, el anticuerpo de dominio único o la composición farmacéutica del mismo se administra tópicamente a piel sana o enferma.

En una realización, el anticuerpo se codifica mediante una molécula de ácido nucleico aislada que comprende SEQ ID NO:350.

- 35 Otros aspectos y realizaciones descritos en el presente documento son solo con fines ilustrativos.

Dibujos

- 40 **Figura 1.** Secuencias de aminoácidos de la familia 1. Esta figura muestra la secuencia de V_H de longitud completa para los clones en la familia 1. Las regiones de entramado (FR) y determinantes de complementariedad (CDR) están etiquetadas. Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están resaltadas en negrita. Las SEQ ID NO se muestran en la tabla 1.

- 45 **Figura 2.** Secuencias de aminoácidos de la familia 2. Esta figura muestra la secuencia de V_H de longitud completa para los clones en la familia 2. Las regiones de entramado (FR) y determinantes de complementariedad (CDR) están etiquetadas. Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están resaltadas en negrita. Las SEQ ID NO se muestran en la tabla 2.

- 50 **Figura 3.** Secuencias de aminoácidos de la familia 3. Esta figura muestra la secuencia de V_H de longitud completa para los clones en la familia 3. Las regiones de entramado (FR) y determinantes de complementariedad (CDR) están etiquetadas. Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están resaltadas en negrita. Las SEQ ID NO se muestran en la tabla 3.

- 55 **Figura 4.** Secuencias de aminoácidos de la familia 4. Esta figura muestra la secuencia de V_H de longitud completa para los clones en la familia 4. Las regiones de entramado (FR) y determinantes de complementariedad (CDR) están etiquetadas. Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están resaltadas en negrita. Las SEQ ID NO se muestran en la tabla 4.

- 60 **Figura 5.** Secuencias de aminoácidos de la familia 5. Esta figura muestra la secuencia de V_H de longitud completa para los clones en la familia 5. Las regiones de entramado (FR) y determinantes de complementariedad (CDR) están etiquetadas. Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 están resaltadas en negrita. Las SEQ ID NO se muestran en la tabla 5.

- 65 **Figura 6. 6A.** Amplificación por PCR del armazón 1-02 de V_H en la que el carril M: escalera de ADN de 1 kb Generuler (Fermentas SM0311), carril 1: armazón 1-02 de V_H, carril 2: sin control de molde para PCR; la flecha

muestra productos de PCR de aproximadamente 300 pb. **M**: escalera de ADN de 1 kb Generuler (Fermentas SM0311). **6B**. Amplificación por PCR de dominios de CDR3 humanos de ADNc en la que M: escalera de ADN de 1 kb Generuler (Fermentas SM0311), carril 1: dominios de CDR3 amplificados a partir de ADNc de ganglio linfático humano; carril 2: dominios de CDR3 amplificados a partir de ADNc de médula ósea humana, carril 3: dominios de CDR3 amplificados a partir de ADNc de bazo humano; carril 4: dominios de CDR3 amplificados a partir de ADNc leucocitos de sangre periférica humana, carril 5: sin control de molde para PCR. La flecha muestra productos de amplificación por PCR en el intervalo de 50-100 pb. M: escalera de ADN de 1 kb Generuler (Fermentas SM0311). **6C**. Ensamblaje y amplificación por PCR de arrastre del armazón 1-02 de V_H más dominios de CDR3 humanos, carril M: escalera de ADN de 1 kb Generuler (Fermentas SM0311), carriles 1 y 2: armazón 1-02 de V_H + dominios de CDR3 humanos, y carril 3: sin control de molde para PCR. La flecha muestra productos de PCR de aproximadamente 400 pb. M: escalera de ADN de 1 kb Generuler (Fermentas SM0311).

La **Figura 7** muestra ELISA en suero que confirman la respuesta de anticuerpo solo de cadena pesada inducida por inmunógenos.

La **Figura 8** muestra **A**: ELISA en fago de unión a IL-17A y **B**: ELISA en fago de unión a antígeno irrelevante.

La **Figura 9** muestra datos de ensayos de inhibición bioquímicos: **A**: eje x concentración en log₁₀M, eje y % de señal máxima; para V_H 1.1.1 (●) la Cl₅₀ (nM) era de 53, para V_H 1.6.1 (■) la Cl₅₀ (nM) era de 5, para V_H 1.10.1 (▲), la Cl₅₀ (nM) era de 4; para V_H 1.7.1 (▼), la Cl₅₀ (nM) era 7 (●), para V_H 77G9 la Cl₅₀ (nM) era de 6. **B**: eje x concentración (M), eje y % de señal máxima; para V_H 37E4 (●) la Cl₅₀ (nM) era de 56, para V_H 53E11 (■) la Cl₅₀ (nM) era de 195, para V_H 1.1.1 (A), la Cl₅₀ (nM) era de 29; para V_H 54D5 (▼), la Cl₅₀ (nM) era de 124 (●), para V_H 37B5 (◆) la Cl₅₀ (nM) no se determinó.

La **Figura 10** muestra datos de ensayos basados en células: **A**: A: el eje x muestra la concentración en M(log)₁₀, el eje y muestra la densidad óptica DO 450 nm, para V_H 8E10 (■), V_H 2.1.1 (●) y V_H 86A5 (●). **B**: el eje x muestra la concentración de V_H en M(log)₁₀, el eje y muestra la densidad óptica DO 450 nm, para MAB317 (■), V_H 1.3.1 (▲), V_H 3.2.1 (◆) y V_H KLH86A5 (●).

La **Figura 11** muestra los resultados de los ensayos de unión BIAcore® para A: V_H 1.1.1 (5 nM), V_H 1.10.1 (1 nM), V_H 1.6.1 (630 pM), V_H 1.3.1 (230 pM).

Figura 12 Optimización del clon 1.1 de V_H. La secuencia de aminoácidos del clon 1.1. se muestra en la línea superior.

Figura 13 A y B muestran los resultados de ELISA de especificidad.

La **Figura 14** muestra los resultados de competición por epítopos, 1.3.1 y V_H 3.1.1 se unen al mismo epítipo, 3.2.1 se une a un epítipo diferente.

La **Figura 15** muestra los resultados de HPLC para A. V_H 1.10.1, B. V_H 1.17.1, C. V_H 1.3.1, D. V_H 186D2, E. V_H 1.16.1, F. V_H 1.22.1, G. V_H 1.18.1, H. V_H 1.17.1, I. V_H 1.21.1, J. V_H 1.20.1

La **Figura 16** muestra A: resultados de BIAcore® para V_H 1.3.2 (KD 630 pM) y V_H 1.3.3, B: resultados de BIAcore® para V_H 1.2.2 y V_H 1.3.3 (KD 550 pM) y C: resultados de un ensayo basado en células, inhibición de la liberación de IL6 inducida por IL-17A (18 horas) V_H 1.3.2 (●) CE50 5.710e-010; V_H 1.2.3 (■) CE50 3.998e-010.

Figura 17 A. Análisis de la fracción de V_H purificada final del clon 1.10.2 mediante SDS-PAGE y SEC-HPLC. Las fracciones se analizaron en condiciones reductoras, a través de un gel al 4-20%. Carril 1, patrones de proteína (500 ng cada uno); Carril 2, clon 1.10.2 purificado (5 µg). **B**. El clon 1.10.2 purificado se analizó adicionalmente mediante SEC-HPLC para confirmar que la proteína era monomérica.

Figura 18. Inmunofluorescencia. Se puso piel humana intacta y sometida a abrasión con cinta en células Bronaugh y se incubó 24 horas con PBS con IgG. La tinción en estos experimentos y que puede verse en la imagen a color original es tal como sigue: rojo=IgG, verde= cadherina en las membranas celulares. La fila superior muestra solo la detección de IgG en áreas más brillantes (rojo en la imagen de IHC). La fila central muestra solo cadherina en áreas más brillantes (verde en la imagen de IHC). La fila inferior muestra la detección de IgG y de cadherina fusionada en una imagen.

Figura 19. Resultados de ELISA en fluidos receptores (limpios) de un estudio de penetración sobre piel normal intacta con el clon 1.10.2. Se tomaron muestras a un intervalo de 6, 12, 18 y 24 horas para cada muestra de izquierda a derecha.

Figura 20. Resultados de ELISA en fluidos receptores (limpios) de un estudio de penetración sobre piel sometida a abrasión con cinta con el clon 1.10.2. Se tomaron muestras a un intervalo de 6, 12, 18 y 24 horas para cada muestra de izquierda a derecha.

Figura 21. Imagen de IHC del clon 1.10.2 e IgG en piel (en la formulación de prototipo C1; PBS). La tinción en estos experimentos es tal como sigue: rojo = V_H (etiqueta anti-His) o IgG (IgG anti-ratón); verde = cadherina (membranas celulares); azul = núcleos (ADN). La fila superior muestra solo la detección de V_H en rojo excepto la última columna que muestra detección de IgG (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC). La fila inferior tiene detección de V_H/IgG (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) fusionada con detección de cadherina (áreas más brillantes, verde en la imagen de IHC) y núcleos (áreas más brillantes, azul en la imagen de IHC).

Figura 22. Imagen de IHC del clon 1.10.2 (en la formulación de prototipo C2; μ -emulsión) en la piel. La tinción en estos experimentos es tal como sigue: rojo = V_H (etiqueta anti-His); verde = cadherina (membranas celulares); azul = núcleos (ADN). Desde la izquierda; 1ª imagen detección de V_H (áreas más brillantes, rojo) solo, 2ª detección de V_H (áreas más brillantes, rojo) fusionada con detección de cadherina (áreas más brillantes, verde en la imagen de IHC) y núcleos (áreas más brillantes, azul en la imagen de IHC), 3ª detección V_H (rojo) solo, 4ª detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) fusionada con cadherina (áreas más brillantes, verde en la imagen de IHC) y núcleos (áreas más brillantes, azul en la imagen de IHC).

Figura 23. Imagen de IHC del clon 1.10.2 (en la formulación de prototipo C3; DMSO al 35%) en la piel. La tinción en estos experimentos es tal como sigue: rojo = V_H (etiqueta anti-His); verde = cadherina (membranas celulares); azul = núcleos (ADN). Desde la izquierda; 1ª imagen detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) solo, 2ª detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) fusionada con detección de cadherina (áreas más brillantes, verde en la imagen de IHC) y núcleos (áreas más brillantes, azul en la imagen de IHC), 3ª detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) solo, 4ª detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) fusionada con cadherina (áreas más brillantes, verde en la imagen de IHC) y núcleos (áreas más brillantes, azul en la imagen de IHC).

Figura 24. Imagen de IHC del clon 1.10.2 (en la formulación de prototipo 1; propilenglicol al 35%) en la piel. La tinción en estos experimentos es tal como sigue: rojo = V_H (etiqueta anti-His); verde = cadherina (membranas celulares); azul = núcleos (ADN). Desde la izquierda; 1ª imagen detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) solo, 2ª detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) fusionada con detección de cadherina (áreas más brillantes, verde en la imagen de IHC) y núcleos (áreas más brillantes, azul), 3ª detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) solo, 4ª detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) fusionada con cadherina (áreas más brillantes, verde en la imagen de IHC) y núcleos (áreas más brillantes, azul).

Figura 25. Imagen de IHC del clon 1.10.2 (en la formulación de prototipo 2; Transcutol® al 24%) en la piel. La tinción en estos experimentos es tal como sigue: rojo = V_H (etiqueta anti-His); verde = cadherina (membranas celulares); azul = núcleos (ADN). Desde la izquierda; 1ª imagen detección de V_H (áreas más brillantes, rojo/verde en la imagen de IHC) solo, 2ª detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) fusionada con detección de cadherina (áreas más brillantes, verde en la imagen de IHC) y áreas más brillantes de núcleos (áreas más brillantes, azul en la imagen de IHC), 3ª detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) solo, 4ª detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) fusionada con cadherina (áreas más brillantes, verde en la imagen de IHC) y núcleos (áreas más brillantes, azul en la imagen de IHC).

Figura 26. Imagen de IHC del clon 1.10.2 (en la formulación de prototipo 3; propilenglicol al 25% y EtOH al 10%) en la piel. La tinción en estos experimentos es tal como sigue: rojo = V_H (etiqueta anti-His); verde = cadherina (membranas celulares); azul = núcleos (ADN). Desde la izquierda; 1ª imagen detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) solo, 2ª detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) fusionada con detección de cadherina (áreas más brillantes, verde en la imagen de IHC) y núcleos (áreas más brillantes, azul en la imagen de IHC), 3ª áreas más brillantes de detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) solo, 4ª detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) fusionada con cadherina (áreas más brillantes, verde en la imagen de IHC) y núcleos (áreas más brillantes, azul en la imagen de IHC).

Figura 27. Imagen de IHC del clon 1.10.2 en la formulación de prototipo 4; propilenglicol al 20%, miristato de isopropilo al 10%, Brij® 721 al 3% y Brij® 72 al 2%) en la piel. La tinción en estos experimentos es tal como sigue: rojo = V_H (etiqueta anti-His); verde = cadherina (membranas celulares); azul = núcleos (ADN). Desde la izquierda; 1ª imagen detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) solo, 2ª áreas más brillantes de detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) fusionada con detección de cadherina (áreas más brillantes, verde en la imagen de IHC) y núcleos (áreas más brillantes, azul en la imagen de IHC), 3ª áreas más brillantes de detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) solo, 4ª detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) fusionada con cadherina (áreas más brillantes, verde en la imagen de IHC) y núcleos (áreas más brillantes, azul en la imagen de IHC).

Figura 28. Imagen de IHC del clon 1.10.2: (en la formulación de prototipo 5; Azone al 10% (laurocapram), Brij® 721 al 3% y Brij® 72 al 2%) en la piel. La tinción en estos experimentos es tal como sigue: rojo = V_H (etiqueta anti-His); verde = cadherina (membranas celulares); azul = núcleos (ADN). Desde la izquierda; 1ª imagen detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) solo, 2ª detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) fusionada con detección de cadherina (áreas más brillantes, verde en la imagen de IHC) y núcleos (áreas más brillantes, azul en la imagen de IHC), 3ª detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) solo, 4ª detección de V_H (áreas más brillantes, rojo en la imagen de IHC) fusionada con cadherina (áreas más brillantes, verde) y núcleos (áreas más brillantes, azul en la imagen de IHC).

Figura 29. Muestra los resultados de los ensayos de unión BIAcore®. **A:**1.1 **B:** 1.10 **C:** 1.1-1.10.

Figura 30. Muestra los resultados para el análisis Octet para **1.** 3.2-2(G₄S)-1.2 **2.** 3.2-6(G₄S)-1.2 **3.** 1.2

Figura 31. Muestra los resultados de los ensayos de unión BIAcore®. **1:** 3.2 **2:** 1.2 **3:** 3.2-2(G₄S)-1.2 **4:** 3.2-6(G₄S)-1.2; n=1

Figura 32. Muestra la determinación de KD en ensayos de unión BIAcore®. **1:** 3.2 **2:** 1.2 **3:** 3.2-2(G₄S)-1.2 **4:** 3.2-6(G₄S)-1.2 n=2

Figura 33. Muestra los resultados de un ensayo de liberación de IL-6. Se muestran valores de CE50 en B **1**• (curva superior); **3.2 2**•: 1.2 **3**▲: 3.2-2(G₄S)-1.2 **4**•: 3.2-6(G₄S)-1.2

Descripción detallada

La presente invención se describirá ahora adicionalmente. En los siguientes párrafos se definen en más detalle diferentes aspectos de la invención.

Generalmente, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, patología, oncología, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y de ácidos nucleicos e hibridación descritas en el presente documento son aquellas ampliamente conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Los métodos y las técnicas de la presente divulgación se realizan generalmente según métodos convencionales ampliamente conocidos en la técnica y tal como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se discuten por toda la presente memoria descriptiva a menos que se indique lo contrario. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante, tal como se llevan a cabo comúnmente en la técnica o tal como se describe en el presente documento. Las nomenclaturas usadas en relación con, y los procedimientos de laboratorio y las técnicas de, química analítica, química orgánica sintética, química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son aquellas ampliamente conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Se usan técnicas estándar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéuticas y el tratamiento de pacientes.

La familia de citocinas de IL-17 incluye seis miembros, IL-17/IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E/IL-25 e IL-17F, que se producen mediante múltiples tipos celulares. Los miembros de esta familia tienen un extremo C-terminal altamente conservado que contiene una estructura de pliegue de nudo de cisteína. La mayoría de las proteínas de IL-17 se secretan como dímeros ligados por disulfuro, con la excepción de IL-17B, que se secreta como homodímero no covalente.

La señalización mediante citocinas de la familia de IL-17 está mediada por miembros de la familia de receptores de IL-17, IL-17 R/IL-17 RA, IL-17 B R/IL-17 RB, IL-17 RC, IL-17 RD e IL-17 RE. La activación de estos receptores desencadena rutas intracelulares que inducen la producción de citocinas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos. IL-17A, IL-17F e IL-17A/F se producen principalmente mediante células T activadas y se señalizan a través de un complejo de receptores oligomerizado que consiste en IL-17 RA e IL-17 RC. La unión de un ligando a este complejo conduce al reclutamiento de las proteínas adaptadoras intracelulares, Act1 y TRAF-6, y la activación en el sentido de 3' de los factores de transcripción, NF kappa B, AP-1 y C/EBP. IL-17E activa rutas de señalización similares a través de un complejo de receptores formado por IL-17 RA e IL-17 B R/IL-17RB. La señalización mediante IL-17E induce respuestas inmunitarias de tipo Th2 y puede estar implicada en el fomento de la patogenia de asma. Se conoce menos sobre las rutas de señalización activadas mediante otras citocinas de la familia de IL-17. Estudios recientes sugieren que IL-17C se produce principalmente mediante células epiteliales y se une a un complejo de receptores que consiste en IL-17 RA e IL-17 RE. La señalización autocrina mediante IL-17C en células epiteliales estimula la producción de péptidos antimicrobianos y citocinas proinflamatorias, pero como IL-17A, la sobreexpresión de IL-17C puede contribuir al desarrollo de enfermedades autoinmunitarias. De manera similar a IL-17E, IL-17B se une a IL-17 B R/IL-17 RB, pero no se han notificado las principales células diana y los efectos la señalización de IL-17B. Además, el receptor para IL-17D y el ligando para IL-17 RD se desconocen actualmente.

La invención proporciona moléculas de unión a IL-17A aisladas que son todas capaces de unirse a IL-17A humana, composiciones y formulaciones farmacéuticas, en particular para la administración tópica, que comprenden tales

moléculas de unión, así como ácidos nucleicos aislados que codifican tales moléculas de unión, vectores de expresión recombinantes y células huésped que comprenden tales ácidos nucleicos para elaborar tales moléculas de unión. También se describen en el presente documento métodos de uso de las moléculas de unión dadas a conocer en el presente documento para detectar IL-17A humana, para inhibir IL-17A humana ya sea *in vitro* o *in vivo*, y en métodos de tratamiento de enfermedad. También se describen en el presente documento moléculas de unión a anti-IL-17A humana humanas aisladas, específicamente aquellas que comprenden, o consisten en, al menos un anticuerpo de dominio único que se une a IL-17A humana con alta afinidad, una constante de disociación lenta y una alta capacidad de neutralización.

Tal como se describe en el presente documento, las moléculas de unión son capaces de unirse específicamente a IL-17A humana y no reaccionan de manera cruzada con, o do no muestran una unión sustancial a, los miembros de la familia de la IL-17 humana. Esta reactividad cruzada limitada con homólogos de IL-17A humana mostrada por las moléculas de unión ofrece ventajas para su uso terapéutico y/o de diagnóstico, ya que se reducen los efectos secundarios por una reactividad cruzada no deseable. Esto ofrece también ventajas en la dosificación para la aplicación terapéutica. Por tanto, las moléculas de unión son capaces de unirse/se dirigen a la IL-17A humana.

Una molécula de unión a IL-17A que se une a IL-17A humana (número de registro Q16552 (Swiss-Prot) que muestra el precursor de longitud completa IL-17A que incluye el péptido señal, SEQ ID NO. 465) y/o IL-17 de macaco cangrejero (Uniprot G7P4U9). La IL-17A humana es un homodímero que consiste en dos cadenas de 155 aminoácidos. Cada cadena polipeptídica incluye un péptido N-terminal de 23 aminoácidos que se escinde para producir un polipéptido maduro de 132 residuos. IL-17A se une a y ejerce sus efectos por medio de la activación de los receptores de IL-17 A y C.

SEQ ID No. 465

MTPGKTSLVSLLLLLSLEAIVKAGITIPRNP GCPNSEDKNFPR TVMVNLNIHNRNTNTN

PKRSSDYNRSTSPWNLHRNEDPERYP SVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPI

QQEILVLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA

Los términos "molécula de unión a IL-17", "proteína de unión a IL-17", "anticuerpo de dominio único anti-IL-17" o "anticuerpo anti-IL-17" se refieren todos a una molécula capaz de unirse al antígeno de IL-17A humana. Por tanto, tal como se usa en el presente documento, IL-17 se refiere habitualmente a IL-17A, a menos que se establezca lo contrario o a menos que el contexto apunte a lo contrario. La reacción de unión puede mostrarse mediante métodos estándar (ensayos cualitativos) que incluyen, por ejemplo, un ensayo de unión, ensayo de competición o un bioensayo para determinar la inhibición de la unión de IL-17 a su receptor o cualquier clase de ensayos de unión, con referencia a una prueba de control negativo en la que un anticuerpo de especificidad sin relación. El término "molécula de unión a IL-17" incluye una proteína de unión a IL-17 o una parte de la misma que es capaz de unirse a IL-17A humana.

La invención se refiere a moléculas de unión aisladas capaces de unirse a IL-17A humana que comprenden un dominio de inmunoglobulina variable de cadena pesada (V_H) que comprende una secuencia de CDR3 tal como se muestra en cualquiera de las figuras 1 a 5 con referencia a las tablas 1 a 5 o una secuencia con al menos el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o más de identidad de secuencia con la misma. En un ejemplo, la molécula de unión comprende un conjunto de secuencias de CDR1, 2 y 3 seleccionadas de los conjuntos de secuencias de CDR1, 2 y 3 tal como se muestran para cualquiera de los clones de cualquiera de las figuras 1 a 5 con referencia a las tablas 1 a 5. En un ejemplo, la molécula de unión comprende un dominio V_H con un conjunto de secuencias de CDR1, 2 y 3 seleccionadas de los conjuntos de secuencias de CDR1, 2 y 3 tal como se muestran para cualquiera de los clones de cualquiera de las figuras 1 a 5 con referencia a las tablas 1 a 5. En una realización, la molécula de unión es un anticuerpo solo de cadena pesada.

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de unión aislada que comprende al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina dirigido contra IL-17A humana, siendo dicho dominio un dominio V_H y comprendiendo dicha molécula de unión a IL-17A al menos un sitio de unión a antígeno.

En un ejemplo, la molécula de unión puede comprender al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina dirigido contra IL-17A humana, siendo dicho dominio un dominio V_H que comprende una secuencia de CDR3 tal como se muestra en cualquiera de las figuras 1 a 5 con referencia a las tablas 1 a 5 o que comprende una secuencia de CDR3 con al menos el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95% o más de identidad de secuencia con dicha secuencia de CDR.

En un ejemplo, dicho al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina comprende un conjunto de CDR1, 2 y 3 o un dominio V_H con un conjunto de secuencias de CDR1, 2 y 3 seleccionadas de los conjuntos de secuencias de CDR1, 2 y 3 tal como se muestran para cualquiera de los clones de cualquiera de las figuras 1 a 5 con referencia a las tablas 1 a 5. En otro ejemplo, la molécula de unión comprende o consiste en un dominio V_H tal como se muestra para unos clones seleccionados de los clones 1.1 a 1.69, 2.1 a 2.9, 3.1 a 3.14, 4.1 o 5.1.

En un ejemplo, dicha homología o identidad de secuencia es de al menos el 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%

“Homología” se refiere generalmente al porcentaje de residuos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos del polipéptido con el que se compara, tras alinear las secuencias y en algunos ejemplos tras introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de homología, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Ninguna extensión N- o C-terminal, etiqueta ni inserción debe interpretarse como que reduce la identidad o la homología. Métodos y programas informáticos para la alineación se conocen ampliamente.

El término “anticuerpo”, se refiere en términos generales a cualquier molécula de inmunoglobulina (Ig), o porción de unión a antígeno de la misma, compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), o cualquier fragmento funcional, mutante, variante o derivación de las mismas, que conserva las características de unión a epítipo esenciales de una molécula de Ig. Tales formatos de mutante, variante o anticuerpo derivado se conocen ampliamente en la técnica. En un anticuerpo de longitud completa, cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por de tres dominios, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, C_L . Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). Cada V_H y V_L está compuesto por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxilo-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las moléculas de inmunoglobulina pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

Las moléculas de unión aisladas pueden comprender o consistir en al menos un anticuerpo de dominio único, siendo dicho dominio un dominio V_H . Por tanto, unas moléculas de unión pueden comprender o consistir en al menos un anticuerpo de dominio de cadena pesada variable único de inmunoglobulina (sVD, sdAb o ISV) que tiene un dominio V_H , pero carece de dominios V_L .

Los anticuerpos de dominio único se han descrito en la técnica; son anticuerpos cuyas regiones determinantes de complementariedad son parte de un polipéptido de dominio único, por ejemplo, un polipéptido de dominio V_H .

Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, la molécula de unión puede comprender dos o más dominios V_H . Tales moléculas de unión pueden ser mono-específicas o multi-específicas, monovalentes o multivalentes tal como se explica en detalle adicionalmente.

Las moléculas de unión que comprenden un anticuerpo de dominio único, siendo dicho dominio un dominio V_H , se denominan también Humabody® V_H .

Por tanto, una molécula de unión no comprende una cadena ligera. En algunos ejemplos, la molécula de unión no comprende dominios de cadena pesada C_{H2} y C_{H3} . En algunos ejemplos, la molécula de unión no comprende una región bisagra ni dominios de cadena pesada C_{H2} y C_{H3} . En algunos ejemplos, la molécula de unión no comprende dominios de cadena pesada C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . En algunos ejemplos, la molécula de unión no comprende un dominio de cadena pesada C_{H1} , un dominio de cadena pesada de región bisagra C_{H2} ni un dominio de cadena pesada C_{H3} . En algunos ejemplos, la molécula de unión no comprende una cadena ligera, un dominio de cadena pesada C_{H1} , un dominio de cadena pesada de región bisagra C_{H2} ni un dominio de cadena pesada C_{H3} .

Cada dominio V_H comprende tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxilo-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Pueden hacerse modificaciones al entramado de V_H para mejorar las propiedades de unión. Por ejemplo, el dominio V_H puede comprender extensiones C- o N-terminales. El dominio V_H puede comprender extensiones C-terminales de desde 1 hasta 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos adicionales. En un ejemplo, el dominio V_H comprende extensiones C-terminales de desde 1 hasta 12 residuos de aminoácido, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos adicionales del dominio C_{H1} . En un ejemplo, dicha extensión comprende al menos 1 residuo de alanina, por ejemplo, un residuo de alanina único, un par de residuos de alanina o un triplete de residuos de alanina. Los dominios V_H pueden comprender residuos C- o N-terminales adicionales, por ejemplo, residuos ligadores y/o etiquetas His, por ejemplo, hexa-His.

Preferiblemente, el uno o más dominios V_H es un dominio V_H humano. Tal como se usa en el presente documento, un dominio V_H humano incluye un dominio V_H que se deriva de o se basa en una secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico de dominio V_H humano. Por tanto, el término incluye regiones de cadena pesada variable derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tal como se usa en el presente documento, el término dominio V_H humano incluye dominios V_H que están aislados de ratones transgénicos que expresan genes V de inmunoglobulina humana, en particular en respuesta a una inmunización con un antígeno de interés. Los dominios V_H

humanos pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas *in vitro*, por ejemplo, mediante mutagénesis aleatoria o específica del sitio, o introducidas mediante mutación somática *in vivo*). Por tanto, el término "dominio V_H humano" incluye también secuencias de V_H humano modificadas.

Por tanto, la invención proporciona una molécula de unión que comprende al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina capaz de unirse a/dirigirse contra IL-17A, siendo dicho dominio un dominio V_H humano y comprendiendo dicha molécula de unión a IL-17A al menos un sitio de unión a antígeno. El anticuerpo de dominio único está dirigido específicamente contra IL-17A humana.

Tal como se usa en el presente documento, el término V_H o "dominio variable" se refiere a dominios variables de inmunoglobulina definidos por Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest, 5ª ed., U.S. Dept. Health & Human Services, Washington, D.C. (1991). La numeración y la posición de los residuos de aminoácido de CDR dentro de los dominios variables es según la convención de numeración Kabat ampliamente conocida.

Más particularmente, en el presente documento se describe un dominio de inmunoglobulina V_H que puede unirse a IL-17 humana con una afinidad, una tasa K_{on}, una tasa K_{off}, K_D y/o K_A tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

Las moléculas de unión pueden comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en el presente documento y secuencias preferidas y/o partes de las mismas, tal como CDR, se definen en el presente documento.

El término "CDR" se refiere a la región determinante de complementariedad dentro de secuencias variables de anticuerpo. Hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se designan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. El término "conjunto de CDR" se refiere a un grupo de tres CDR que aparecen en una región variable única capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDR se han definido de diferente manera según diferentes sistemas. En el presente documento se usa el sistema descrito por Kabat. Los términos "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "etiquetado de Kabat" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Estos términos, que se reconocen en la técnica, hacen referencia a un sistema de numeración de residuos de aminoácido que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácido en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo (Kabat *et al.*, (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 y Kabat, *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación del NIH n.º 91-3242).

Tal como se describe en más detalle en la parte experimental, se aislaron cinco moléculas de unión parentales (dando como resultado 5 familias de clones: el clon 1.1 es el clon parental para la familia 1 tal como se muestra en la Fig. 1, el clon 2.1 es el clon parental para la familia 2 tal como se muestra en la Fig. 2, el clon 3.1 es el clon parental para la familia 3 tal como se muestra en la Fig. 3, el clon 4.1 es el clon parental para la familia 4 tal como se muestra en la Fig. 4 y el clon 5.1 es el clon parental para la familia 5 tal como se muestra en la Fig. 5); teniendo cada molécula parental un conjunto de secuencias de CDR (CDR1, 2 y 3) tal como se muestra en las Figuras 1, 2, 3, 4 y 5. A través de un proceso de optimización, se generó un panel de clones con secuencias de CDR3 derivadas de la secuencia de CDR3 parental para cada una de las familias 1, 2, 3, 4 y 5. Secuencias de dominio V_H optimizadas muestran afinidades mejoradas para IL-17A y potencias mejoradas en el ensayo basado en células de IL-17 en comparación con la molécula parental tal como se muestra en los ejemplos.

En un aspecto, la invención se refiere a una molécula de unión capaz de unirse a IL-17A humana que comprende un dominio V_H humano que comprende una secuencia de la familia 1 o similar a la de la familia 1.

En un ejemplo, la molécula de unión comprende o consiste en al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina capaz de unirse a/dirigirse contra IL-17A, preferiblemente IL-17A humana, siendo dicho dominio un dominio V_H humano y comprendiendo dicha molécula de unión a IL-17A una secuencia de la familia 1 o similar a la de la familia 1. Estas incluyen la secuencia del clon parental (clon 1.1, SEQ ID NO. 4) o una parte de la misma, por ejemplo, una secuencia de CDR3, y secuencias de clones que se derivan del clon parental 1.1 a través de un proceso de optimización, por ejemplo, secuencias tales como se muestran en la Figura 1. Las secuencias de CDR, o partes de las mismas, y las secuencias de V_H de longitud completa de clones en la familia 1 se numeran según la tabla 1 tal como se muestra a continuación.

Tabla 1. Esto muestra SEQ ID NOs. de secuencias de aminoácidos de CDR de la familia 1 y de secuencias de V_H de longitud completa de la familia 1. Secuencias correspondientes se muestran en la Figura 1.

Clon	SEQ ID NO. de CDR1	SEQ ID NO. de CDR2	SEQ ID NO. de CDR3	SEQ ID NO. de secuencia de V _H de longitud completa
1,1	SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 2	SEQ ID NO. 3	SEQ ID NO. 4

ES 3 023 709 T3

Clon	SEQ ID NO. de CDR1	SEQ ID NO. de CDR2	SEQ ID NO. de CDR3	SEQ ID NO. de secuencia de V _H de longitud completa
1,2	SEQ ID NO. 5	SEQ ID NO. 6	SEQ ID NO. 7	SEQ ID NO. 8
1,3	SEQ ID NO. 9	SEQ ID NO. 10	SEQ ID NO. 11	SEQ ID NO. 12
1,4	SEQ ID NO. 13	SEQ ID NO. 14	SEQ ID NO. 15	SEQ ID NO. 16
1,5	SEQ ID NO. 17	SEQ ID NO. 18	SEQ ID NO. 19	SEQ ID NO. 20
1,6	SEQ ID NO. 21	SEQ ID NO. 22	SEQ ID NO. 23	SEQ ID NO. 24
1,7	SEQ ID NO. 25	SEQ ID NO. 26	SEQ ID NO. 27	SEQ ID NO. 28
1,8	SEQ ID NO. 29	SEQ ID NO. 30	SEQ ID NO. 31	SEQ ID NO. 32
1,9	SEQ ID NO. 33	SEQ ID NO. 34	SEQ ID NO. 35	SEQ ID NO. 36
1,10	SEQ ID NO. 37	SEQ ID NO. 38	SEQ ID NO. 39	SEQ ID NO. 40
1,11	SEQ ID NO. 41	SEQ ID NO. 42	SEQ ID NO. 43	SEQ ID NO. 44
1,12	SEQ ID NO. 45	SEQ ID NO. 46	SEQ ID NO. 47	SEQ ID NO. 48
1,13	SEQ ID NO. 49	SEQ ID NO. 50	SEQ ID NO. 51	SEQ ID NO. 52
1,14	SEQ ID NO. 53	SEQ ID NO. 54	SEQ ID NO. 55	SEQ ID NO. 56
1,15	SEQ ID NO. 57	SEQ ID NO. 58	SEQ ID NO. 59	SEQ ID NO. 60
1,16	SEQ ID NO. 61	SEQ ID NO. 62	SEQ ID NO. 63	SEQ ID NO. 64
1,17	SEQ ID NO. 65	SEQ ID NO. 66	SEQ ID NO. 67	SEQ ID NO. 68
1,18	SEQ ID NO. 69	SEQ ID NO. 70	SEQ ID NO. 71	SEQ ID NO. 72
1,19	SEQ ID NO. 73	SEQ ID NO. 74	SEQ ID NO. 75	SEQ ID NO. 76
1,20	SEQ ID NO. 77	SEQ ID NO. 78	SEQ ID NO. 79	SEQ ID NO. 80
1,21	SEQ ID NO. 81	SEQ ID NO. 82	SEQ ID NO. 83	SEQ ID NO. 84
1,22	SEQ ID NO. 85	SEQ ID NO. 86	SEQ ID NO. 87	SEQ ID NO. 88
1,23	SEQ ID NO. 89	SEQ ID NO. 90	SEQ ID NO. 91	SEQ ID NO. 92
1,24	SEQ ID NO. 93	SEQ ID NO. 94	SEQ ID NO. 95	SEQ ID NO. 96
1,25	SEQ ID NO. 97	SEQ ID NO. 98	SEQ ID NO. 99	SEQ ID NO. 100
1,26	SEQ ID NO. 101	SEQ ID NO. 102	SEQ ID NO. 103	SEQ ID NO. 104
1,27	SEQ ID NO. 105	SEQ ID NO. 106	SEQ ID NO. 107	SEQ ID NO. 108
1,28	SEQ ID NO. 109	SEQ ID NO. 110	SEQ ID NO. 111	SEQ ID NO. 112
1,29	SEQ ID NO. 113	SEQ ID NO. 114	SEQ ID NO. 115	SEQ ID NO. 116
1,30	SEQ ID NO. 117	SEQ ID NO. 118	SEQ ID NO. 119	SEQ ID NO. 120
1,31	SEQ ID NO. 121	SEQ ID NO. 122	SEQ ID NO. 123	SEQ ID NO. 124
1,32	SEQ ID NO. 125	SEQ ID NO. 126	SEQ ID NO. 127	SEQ ID NO. 128
1,33	SEQ ID NO. 129	SEQ ID NO. 130	SEQ ID NO. 131	SEQ ID NO. 132
1,34	SEQ ID NO. 133	SEQ ID NO. 134	SEQ ID NO. 135	SEQ ID NO. 136
1,35	SEQ ID NO. 137	SEQ ID NO. 138	SEQ ID NO. 139	SEQ ID NO. 140
1,36	SEQ ID NO. 141	SEQ ID NO. 142	SEQ ID NO. 143	SEQ ID NO. 144
1,37	SEQ ID NO. 145	SEQ ID NO. 146	SEQ ID NO. 147	SEQ ID NO. 148
1,38	SEQ ID NO. 149	SEQ ID NO. 150	SEQ ID NO. 151	SEQ ID NO. 152
1,39	SEQ ID NO. 153	SEQ ID NO. 154	SEQ ID NO. 155	SEQ ID NO. 156
1,40	SEQ ID NO. 157	SEQ ID NO. 158	SEQ ID NO. 159	SEQ ID NO. 160
1,41	SEQ ID NO. 161	SEQ ID NO. 162	SEQ ID NO. 163	SEQ ID NO. 164
1,42	SEQ ID NO. 165	SEQ ID NO. 166	SEQ ID NO. 167	SEQ ID NO. 168

Clon	SEQ ID NO. de CDR1	SEQ ID NO. de CDR2	SEQ ID NO. de CDR3	SEQ ID NO. de secuencia de V _H de longitud completa
1,43	SEQ ID NO. 169	SEQ ID NO. 170	SEQ ID NO. 171	SEQ ID NO. 172
1,44	SEQ ID NO. 173	SEQ ID NO. 174	SEQ ID NO. 175	SEQ ID NO. 176
1,45	SEQ ID NO. 177	SEQ ID NO. 178	SEQ ID NO. 179	SEQ ID NO. 180
1,46	SEQ ID NO. 181	SEQ ID NO. 182	SEQ ID NO. 183	SEQ ID NO. 184
1,47	SEQ ID NO. 185	SEQ ID NO. 186	SEQ ID NO. 187	SEQ ID NO. 188
1,48	SEQ ID NO. 189	SEQ ID NO. 190	SEQ ID NO. 191	SEQ ID NO. 192
1,49	SEQ ID NO. 193	SEQ ID NO. 194	SEQ ID NO. 195	SEQ ID NO. 196
1,50	SEQ ID NO. 197	SEQ ID NO. 198	SEQ ID NO. 199	SEQ ID NO. 200
1,51	SEQ ID NO. 201	SEQ ID NO. 202	SEQ ID NO. 203	SEQ ID NO. 204
1,52	SEQ ID NO. 205	SEQ ID NO. 206	SEQ ID NO. 207	SEQ ID NO. 208
1,53	SEQ ID NO. 209	SEQ ID NO. 210	SEQ ID NO. 211	SEQ ID NO. 212
1,54	SEQ ID NO. 213	SEQ ID NO. 214	SEQ ID NO. 215	SEQ ID NO. 216
1,55	SEQ ID NO. 217	SEQ ID NO. 218	SEQ ID NO. 219	SEQ ID NO. 220
1,56	SEQ ID NO. 221	SEQ ID NO. 222	SEQ ID NO. 223	SEQ ID NO. 224
1,57	SEQ ID NO. 225	SEQ ID NO. 226	SEQ ID NO. 227	SEQ ID NO. 228
1,58	SEQ ID NO. 229	SEQ ID NO. 230	SEQ ID NO. 231	SEQ ID NO. 232
1,59	SEQ ID NO. 233	SEQ ID NO. 234	SEQ ID NO. 235	SEQ ID NO. 236
1,60	SEQ ID NO. 237	SEQ ID NO. 238	SEQ ID NO. 239	SEQ ID NO. 240
1,61	SEQ ID NO. 241	SEQ ID NO. 242	SEQ ID NO. 243	SEQ ID NO. 244
1,62	SEQ ID NO. 245	SEQ ID NO. 246	SEQ ID NO. 247	SEQ ID NO. 248
1,63	SEQ ID NO. 438	SEQ ID NO. 439	SEQ ID NO. 440	SEQ ID NO. 441
1,64	SEQ ID NO. 442	SEQ ID NO. 443	SEQ ID NO. 444	SEQ ID NO. 445
1,65	SEQ ID NO. 446	SEQ ID NO. 447	SEQ ID NO. 448	SEQ ID NO. 449
1,66	SEQ ID NO. 450	SEQ ID NO. 451	SEQ ID NO. 452	SEQ ID NO. 453
1,67	SEQ ID NO. 454	SEQ ID NO. 455	SEQ ID NO. 456	SEQ ID NO. 457
1,68	SEQ ID NO. 458	SEQ ID NO. 459	SEQ ID NO. 460	SEQ ID NO. 461
1,69	SEQ ID NO. 462	SEQ ID NO. 463	SEQ ID NO. 464	SEQ ID NO. 466

La molécula de unión de la familia 1 o similar a la de la familia 1 puede comprender un dominio V_H humano que comprende una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO. 3 o una secuencia que tiene al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con SEQ ID NO. 3.

5 En un ejemplo, la molécula de unión de la familia 1 o similar a la de la familia 1 comprende al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina dirigido contra IL-17A, siendo dicho dominio un dominio V_H humano y comprendiendo dicho dominio V_H humano al menos un sitio de unión a antígeno que comprende una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO. 3 o una secuencia que tiene al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con SEQ ID NO. 3.

En un ejemplo de los aspectos, la homología es al menos el 90% de homología con SEQ ID NO. 3.

15 En un ejemplo, el dominio V_H comprende una secuencia de CDR3 que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO. 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83, 87, 91, 95, 99, 103, 107, 111, 115, 119, 123, 127, 131, 135, 139, 143, 147, 151, 155, 159, 163, 167, 171, 175, 179, 183, 187, 191, 195, 199, 203, 207, 211, 215, 219, 223, 227, 231, 235, 239, 243 o 247, 440, 444, 448, 452, 456, 460 o 464.

20 En un ejemplo, la molécula de unión de la familia 1 o similar a la de la familia 1 comprende al menos un sitio de unión a antígeno que comprende CDR1, CDR2 y CDR3, comprendiendo dicha CDR1 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1 o una secuencia con al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con

la misma, comprendiendo dicha CDR2 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 2 o una secuencia con al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con la misma, y comprendiendo dicha CDR3 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 3 o una secuencia con al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con la misma. Por ejemplo, la secuencia de CDR puede ser una secuencia de CDR seleccionada de una de las secuencias mostradas en la Figura 1.

En un ejemplo, dicha CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO. 1 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO. 2 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO. 3 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, las secuencias de CDR del dominio V_H son tal como se muestran para los clones 1.1 a 1.69 como en la figura 1 o combinaciones de las mismas. En un ejemplo, CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101, 105, 109, 113, 117, 121, 125, 129, 133, 137, 141, 145, 149, 153, 157, 161, 165, 169, 173, 177, 181, 185, 189, 193, 197, 201, 205, 209, 213, 217, 221, 225, 229, 233, 237, 241, 245, 438, 442, 446, 450, 454, 458 o 462, CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142, 146, 150, 154, 158, 162, 166, 170, 174, 178, 182, 186, 190, 194, 198, 202, 206, 210, 214, 218, 222, 226, 230, 234, 238, 242, 246, 439, 443, 447, 451, 455, 459 o 463 y CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83, 87, 91, 95, 99, 103, 107, 111, 115, 119, 123, 127, 131, 135, 139, 143, 147, 151, 155, 159, 163, 167, 171, 175, 179, 183, 187, 191, 195, 199, 203, 207, 211, 215, 219, 223, 227, 231, 235, 239, 243, 247 440, 444, 448, 452, 456, 460 o 464.

En un ejemplo, CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1, CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 2 y CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 3.

En el presente documento se describe un dominio V_H que tiene combinaciones de CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestra para los clones 1.1 a 1.69 en la Figura 1. Por ejemplo, la molécula de unión tiene una combinación de CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestra para los clones 1.1 a 1.22 en la Figura 1. Por tanto, por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 1, siendo CDR2 SEQ ID NO. 2 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 3. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 5, siendo CDR2 SEQ ID NO. 6 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 7. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 9, siendo CDR2 SEQ ID NO. 10 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 11. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 13, siendo CDR2 SEQ ID NO. 14 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 15. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 17, siendo CDR2 SEQ ID NO. 18 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 19. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 21, siendo CDR2 SEQ ID NO. 22 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 23. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 25, siendo CDR2 SEQ ID NO. 26 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 27. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 29, siendo CDR2 SEQ ID NO. 30 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 31. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 33, siendo CDR2 SEQ ID NO. 34 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 35. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 37, siendo CDR2 SEQ ID NO. 38 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 39. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 41, siendo CDR2 SEQ ID NO. 42 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 43. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 45, siendo CDR2 SEQ ID NO. 46 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 47. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 49, siendo CDR2 SEQ ID NO. 50 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 51. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 53, siendo CDR2 SEQ ID NO. 54 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 55. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 57, siendo CDR2 SEQ ID NO. 58 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 59. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 61, siendo CDR2 SEQ ID NO. 62 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 63. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 65, siendo CDR2 SEQ ID NO. 66 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 67. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 69, siendo CDR2 SEQ ID NO. 70 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 71. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 73, siendo CDR2 SEQ ID NO. 74 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 75. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 77, siendo CDR2 SEQ ID NO. 78 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 79. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 81, siendo CDR2 SEQ ID NO. 82 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 83. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 85, siendo CDR2 SEQ ID NO. 86 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 87.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 1 o similar a la de la familia 1 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 4 o una secuencia con al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 96%, 97%, 98%, 99% de homología con la misma. En un ejemplo, la homología es de al menos el 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Las secuencias de CDR de tales secuencias de V_H se muestran en la Figura 1. Por ejemplo, el dominio V_H comprende o consiste en SEQ ID NO. 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 216, 220, 224, 228, 232, 236, 240, 244 o 248, 441, 445, 449, 453, 457, 461 o 466.

Por ejemplo, el dominio V_H se selecciona de una de las secuencias anteriores, pero comprende una o más sustituciones de aminoácido, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácido. En un ejemplo, la una o más sustituciones de aminoácido están en una o más de las áreas de entramado. Por ejemplo, la una o más sustituciones de aminoácido está en una o más de las CDR. En un ejemplo, las sustituciones de aminoácido están en las secuencias de entramado y de CDR. En un ejemplo, el dominio V_H comprende o consiste en SEQ ID NO. 4 o 8 o una secuencia que comprende una o más sustituciones de aminoácido, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácido.

En el presente documento se describe una molécula de unión que comprende o que consiste en al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina dirigido contra IL-17A, siendo dicho dominio un dominio V_H humano y comprendiendo o consistiendo dicho dominio V_H en SEQ ID NO. 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 216, 220, 224, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 441, 445, 449, 453, 457, 461 o 466 o una secuencia con al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En el presente documento se describe una molécula de unión que comprende o que consiste en un dominio V_H tal como se muestra en SEQ ID NO. 4 o una variante del mismo que tiene las siguientes sustituciones en comparación con SEQ ID NO. 4: el residuo 1 es Q, el residuo 11 es M o W, el residuo 13 es L o R, el residuo 24 es T, el residuo 33 es G, R, N o Q, el residuo 50 es E, K, S, N, G o R, el residuo 52 es K, E, G, D o R, el residuo 53 es P, el residuo 54 es T, el residuo 57 es Q, E o K, el residuo 61 es A, el residuo 62 es S o G, el residuo 77 es K, y/o el residuo 13 es Y.

Las moléculas de unión de la familia 1 o similares a las de la familia 1 tienen preferiblemente valores de KD, Koff, KA, Kd y Cl₅₀ tal como se describe adicionalmente en el presente documento y tal como se muestra en los ejemplos y se expone adicionalmente más adelante.

El término "KD" se refiere a la "constante de disociación de equilibrio" y se refiere al valor obtenido en una medición de valoración en equilibrio, o dividiendo la constante de tasa de disociación (Koff) entre la constante de tasa de asociación (Kon). "KA" se refiere a la constante de afinidad. La constante de tasa de asociación, la constante de tasa de disociación y la constante de disociación de equilibrio se usan para representar la afinidad de unión de un anticuerpo a un antígeno. Métodos para determinar las constantes de tasa de asociación y de disociación se conocen ampliamente en la técnica. El uso de técnicas basadas en fluorescencia ofrece una alta sensibilidad y la capacidad de examinar muestras en tampones fisiológicos en equilibrio. Pueden usarse otros enfoques experimentales e instrumentos tales como un ensayo BIAcore® (análisis de interacción biomolecular).

En el presente documento se describe una molécula de unión capaz de unirse a IL-17A humana que comprende un dominio V_H humano que comprende una secuencia de la familia 2 o similar a la de la familia 2.

En un ejemplo, la molécula de unión comprende o consiste en al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina dirigido contra IL-17A, preferiblemente IL-17A humana, siendo dicho dominio un dominio V_H humano y comprendiendo dicha molécula de unión a IL-17A una secuencia de la familia 2 o similar a la de la familia 2. Estas incluyen la secuencia parental (clon 2.1; SEQ ID NO.252) o una parte de la misma y secuencias de clones que se derivan del clon parental (clon 2.1) o una parte de las mismas, por ejemplo, una secuencia de CDR3, y secuencias de clones de V_H o partes de las mismas que se derivan del clon parental 2.1 a través de un proceso de optimización, por ejemplo, tal como se muestra en la Figura 2. Las secuencias de CDR y las secuencias de longitud completa de clones en la familia 2 se numeran según la tabla 2 tal como se muestra a continuación.

Tabla 2. Esta muestra SEQ ID NOs de secuencias de CDR de la familia 2 y de secuencias de V_H de longitud completa de la familia 2. Secuencias correspondientes se muestran en la Figura 2.

Clon	SEQ ID NO. de CDR1	SEQ ID NO. de CDR2	SEQ ID NO. de CDR3	SEQ ID NO. de secuencia de V _H de longitud completa
2,1	SEQ ID NO. 249	SEQ ID NO. 250	SEQ ID NO. 251	SEQ ID NO. 252

Clon	SEQ ID NO. de CDR1	SEQ ID NO. de CDR2	SEQ ID NO. de CDR3	SEQ ID NO. de secuencia de V _H de longitud completa
2,2	SEQ ID NO. 253	SEQ ID NO. 254	SEQ ID NO. 255	SEQ ID NO. 256
2,3	SEQ ID NO. 257	SEQ ID NO. 258	SEQ ID NO. 259	SEQ ID NO. 260
2,4	SEQ ID NO. 261	SEQ ID NO. 262	SEQ ID NO. 263	SEQ ID NO. 264
2,5	SEQ ID NO. 265	SEQ ID NO. 266	SEQ ID NO. 267	SEQ ID NO. 268
2,6	SEQ ID NO. 269	SEQ ID NO. 270	SEQ ID NO. 271	SEQ ID NO. 272
2,7	SEQ ID NO. 273	SEQ ID NO. 274	SEQ ID NO. 275	SEQ ID NO. 276
2,8	SEQ ID NO. 277	SEQ ID NO. 278	SEQ ID NO. 279	SEQ ID NO. 280
2,9	SEQ ID NO. 281	SEQ ID NO. 282	SEQ ID NO. 283	SEQ ID NO. 284

En el presente documento se describe una molécula de unión de la familia 2 o similar a la de la familia 2 que comprende un dominio V_H humano que comprende una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO. 251 o una secuencia que tiene al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con SEQ ID NO. 251.

En un ejemplo, la molécula de unión de la familia 2 o similar a la de la familia 2 comprende al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina dirigido contra IL-17A, siendo dicho dominio un dominio V_H humano y comprendiendo dicho dominio V_H humano al menos un sitio de unión a antígeno que comprende una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO. 251 o una secuencia que tiene al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con SEQ ID NO. 251.

En un ejemplo de estos aspectos, la homología es de al menos el 90%.

En un ejemplo, el dominio V_H comprende o consiste en una CDR3 seleccionada de SEQ ID NO. 251, 255, 259, 263, 267, 271, 275, 279 o 283.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 2 o similar a la de la familia 2 comprende una molécula de unión que comprende o que consiste en al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina dirigido contra IL-17, siendo dicho dominio un dominio V_H humano y comprendiendo dicha molécula de unión a IL-17 al menos un sitio de unión a antígeno que comprende CDR1, CDR2 y CDR3, comprendiendo o consistiendo dicha CDR1 en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 249 o una secuencia con al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con la misma, comprendiendo o consistiendo dicha CDR2 en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 250 o una secuencia con al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con la misma, y comprendiendo o consistiendo dicha CDR3 en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 251 o una secuencia con al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con la misma.

En un ejemplo, dicha CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 249 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 250 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 251 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, las secuencias de CDR del dominio V_H son tal como se muestra para los clones 2.1 a 2.9 como en la figura 2 o combinaciones de las mismas. En un ejemplo, CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 249, 253, 257, 261, 265, 269, 273, 277 o 281, CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 250, 254, 258, 262, 266, 270, 274, 278 o 282 y CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 251, 255, 259, 263, 267, 271, 275, 279 o 283.

En el presente documento se describe un dominio V_H que tiene combinaciones de CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestra para 2.1 a 2.9 en la Figura 2. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 249, siendo CDR2 SEQ ID NO. 250 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 251. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 253, siendo CDR2 SEQ ID NO. 254 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 255. Por tanto, por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 257, siendo CDR2 SEQ ID NO. 258 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 259. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 261, siendo CDR2 SEQ ID NO. 262 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 263. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 265, siendo CDR2 SEQ ID NO. 266 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 267. Por ejemplo, la

molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 269, siendo CDR2 SEQ ID NO. 270 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 271. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 273, siendo CDR2 SEQ ID NO. 274 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 275. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 277, siendo CDR2 SEQ ID NO. 278 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 279. Por ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 281, siendo CDR2 SEQ ID NO. 282 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 283.

La secuencia de la familia 2 o similar a la de la familia 2 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 252 o una secuencia con al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 87%, 86%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. En un ejemplo, la homología es de al menos el 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Las secuencias de CDR de tales secuencias se muestran en la Figura 2. Por ejemplo, el dominio V_H comprende o consiste en SEQ ID NO. 252, 256, 260, 264, 268, 272, 276, 280 o 284.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 2 o similar a la de la familia 2 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 252, 256, 260, 264, 268, 272, 276, 280 o 284, o una secuencia con al menos el 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 96%, 97%, 98%, 99% de homología con las mismas. Las secuencias de CDR de tales secuencias se listan más adelante.

Por ejemplo, el dominio V_H se selecciona de una de las secuencias anteriores, pero comprende una o más sustituciones de aminoácido, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácido. En un ejemplo, la una o más sustituciones de aminoácido están en una o más de las áreas de entramado. Por ejemplo, la una o más sustituciones de aminoácido están en una o más de las CDR. En un ejemplo, las sustituciones de aminoácido are en las secuencias de entramado y de CDR. En un ejemplo, el dominio V_H comprende o consiste en SEQ ID NO. 252 o una secuencia que comprende una o más sustituciones de aminoácido, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácido.

En otro aspecto, la invención se refiere a una molécula de unión que comprende o que consiste en un dominio V_H tal como se muestra en SEQ ID NO. 252 o una variante del mismo que tiene las siguientes sustituciones en comparación con SEQ ID NO. 252: el residuo 1 es Q, el 31 es A o G, el residuo es W, el residuo 43 es A, el residuo 50 es N, el residuo 77 es N y/o el residuo 78 es A.

Las moléculas de unión de la familia 2 o similares a las de la familia 2 tienen valores de KD, Koff, KA, Kd y Cl₅₀ tal como se describe adicionalmente en el presente documento y tal como se muestra en los ejemplos y se discute adicionalmente más adelante.

En un aspecto, la invención se refiere a una molécula de unión capaz de unirse a IL-17A humana que comprende un dominio V_H humano que comprende una secuencia de la familia 3 o similar a la de la familia 3.

En un ejemplo, la molécula de unión comprende o consiste en al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina dirigido contra IL-17, preferiblemente IL-17 humana, siendo dicho dominio un dominio V_H humano y comprendiendo dicha molécula de unión a IL-17 una secuencia de la familia 3 o similar a la de la familia 3. Estas incluyen la secuencia de clon parental (SEQ ID NO. 288) o una parte de la misma y secuencias de clones que se derivan del clon parental 3.1 o una parte de las mismas, por ejemplo, una secuencia de CDR3, y secuencias de V_H de clones o partes de las mismas que se derivan del clon parental 3.1 a través de un proceso de optimización, por ejemplo, tal como se muestra en la Figura 3. Las secuencias de CDR y las secuencias de longitud completa de clones en la familia 3 se enumeran según la tabla 3 tal como se muestra a continuación.

Tabla 3. Esta muestra SEQ ID NOs de secuencias de CDR de la familia 3 y de secuencias de V_H de longitud completa de la familia 3 que están dentro del alcance de la invención. Secuencias correspondientes se muestran en la Figura 3.

Clon	SEQ ID NO. de CDR1	SEQ ID NO. de CDR2	SEQ ID NO. de CDR3	SEQ ID NO. de V _H de longitud completa
3,1	SEQ ID NO. 285	SEQ ID NO. 286	SEQ ID NO. 287	SEQ ID NO. 288
3,2	SEQ ID NO. 289	SEQ ID NO. 290	SEQ ID NO. 291	SEQ ID NO. 292
3,3	SEQ ID NO. 293	SEQ ID NO. 294	SEQ ID NO. 295	SEQ ID NO. 296
3,4	SEQ ID NO. 297	SEQ ID NO. 298	SEQ ID NO. 299	SEQ ID NO. 300
3,5	SEQ ID NO. 301	SEQ ID NO. 302	SEQ ID NO. 303	SEQ ID NO. 304
3,6	SEQ ID NO. 305	SEQ ID NO. 306	SEQ ID NO. 307	SEQ ID NO. 308
3,7	SEQ ID NO. 309	SEQ ID NO. 310	SEQ ID NO. 311	SEQ ID NO. 312

Clon	SEQ ID NO. de CDR1	SEQ ID NO. de CDR2	SEQ ID NO. de CDR3	SEQ ID NO. de V _H de longitud completa
3,8	SEQ ID NO. 313	SEQ ID NO. 314	SEQ ID NO. 315	SEQ ID NO. 316
3,9	SEQ ID NO. 317	SEQ ID NO. 318	SEQ ID NO. 319	SEQ ID NO. 320
3,10	SEQ ID NO. 321	SEQ ID NO. 322	SEQ ID NO. 323	SEQ ID NO. 324
3,11	SEQ ID NO. 325	SEQ ID NO. 326	SEQ ID NO. 327	SEQ ID NO. 328
3,12	SEQ ID NO. 329	SEQ ID NO. 330	SEQ ID NO. 331	SEQ ID NO. 332
3,13	SEQ ID NO. 333	SEQ ID NO. 334	SEQ ID NO. 335	SEQ ID NO. 366
3,14	SEQ ID NO. 337	SEQ ID NO. 338	SEQ ID NO. 339	SEQ ID NO. 340

En un aspecto, la invención se refiere a una molécula de unión de la familia 3 o similar a la de la familia 3 que comprende un dominio V_H humano que comprende una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO. 287 o una secuencia que tiene al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con SEQ ID NO. 287.

En un ejemplo, la molécula de unión de la familia 3 o similar a la de la familia 3 comprende al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina dirigido contra IL-17A, siendo dicho dominio un dominio V_H humano y comprendiendo dicho dominio V_H humano al menos un sitio de unión a antígeno que comprende una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO. 287 o una secuencia que tiene al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con SEQ ID NO. 287.

En un ejemplo de estos aspectos, la homología es de al menos el 90%.

En un aspecto, la secuencia de CDR3 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO. 287, 291, 295, 299, 303, 307, 311, 315, 319, 323, 327, 335 o 339.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 3 o similar a la de la familia 3 comprende una molécula de unión que comprende o que consiste en al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina dirigido contra IL-17A, siendo dicho dominio un dominio V_H humano y comprendiendo dicha molécula de unión a IL-17A al menos un sitio de unión a antígeno que comprende CDR1, CDR2 y CDR3, comprendiendo o consistiendo dicha CDR1 en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 285 o una secuencia con al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% de homología con la misma, comprendiendo o consistiendo dicha CDR2 en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 286 o una secuencia con al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% de homología con la misma, y comprendiendo o consistiendo dicha CDR3 en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 287 o una secuencia con al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% de homología con la misma.

En un ejemplo, dicha CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 285 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 286 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 287 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, las secuencias de CDR del dominio V_H son tal como se muestra para los clones 3.1 a 3.14 como en la figura 3 o combinaciones de las mismas.

En un aspecto, la invención se refiere a un dominio V_H que tiene combinaciones de CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestra para los clones 3.1 a 3.14 en la Figura 3.

En un ejemplo, CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 285, 289, 293, 297, 301, 305, 309, 313, 317, 321, 325, 329, 333 o 337, CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos 286, 290, 294, 298, 302, 306, 310, 314, 318, 322, 326, 330, 334 o 338 y CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos 287, 291, 295, 299, 303, 307, 311, 315, 319, 323, 327, 335 o 339.

En un aspecto, la invención se refiere a un dominio V_H que tiene combinaciones de CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestra para 3.1 a 3.14 en la Figura 3. Por tanto, en un ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 285, siendo CDR2 SEQ ID NO. 286 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 287. En un ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 289, siendo CDR2

SEQ ID NO. 290 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 291. Por tanto, en un ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 293, siendo CDR2 SEQ ID NO. 294 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 295. En un ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 297, siendo CDR2 SEQ ID NO. 298 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 299. En un ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 301, siendo CDR2 SEQ ID NO. 302 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 303. En un ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 305, siendo CDR2 SEQ ID NO. 306 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 307. En un ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 309, CDR2 SEQ ID NO. 310 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 311. En un ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 313, siendo CDR2 SEQ ID NO. 314 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 315. En un ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 317, siendo CDR2 SEQ ID NO. 318 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 319. En un ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 321, siendo CDR2 SEQ ID NO. 322 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 323. En un ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 325, siendo CDR2 SEQ ID NO. 326 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 327. En un ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 329, siendo CDR2 SEQ ID NO. 330 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 331. En un ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 333, siendo CDR2 SEQ ID NO. 334 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 335. En un ejemplo, la molécula de unión comprende secuencias de CDR1, 2 y 3, siendo CDR1 SEQ ID NO. 337, siendo CDR2 SEQ ID NO. 338 y siendo CDR3 SEQ ID NO. 339.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 3 o similar a la de la familia 3 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 288 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. Las secuencias de CDR de tales secuencias se muestran en la Figura 3. Por ejemplo, el dominio V_H comprende o consiste en SEQ ID NO. 292, 296, 300, 304, 308, 312, 316, 320, 324, 328, 332, 336 o 340.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 3 o similar a la de la familia 3 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 288, 292, 296, 300, 304, 308, 312, 316, 320, 324, 328, 332, 336 o 340, o una secuencia con al menos al menos el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de homología con la misma. En un ejemplo, la homología es de al menos el 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 86%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99%. Las secuencias de CDR de tales secuencias se listan más adelante.

Por ejemplo, el dominio V_H se selecciona de una de las secuencias anteriores, pero comprende una o más sustituciones de aminoácido, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácido. En un ejemplo, la una o más sustituciones de aminoácido están en una o más de las áreas de entramado. Por ejemplo, la una o más sustituciones de aminoácido están en una o más de las regiones CDR. En un ejemplo, las sustituciones de aminoácido están en las secuencias de entramado y de CDR. En un ejemplo, el dominio V_H comprende o consiste en SEQ ID NO. 288 o una secuencia que comprende una o más sustituciones de aminoácido, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácido.

En el presente documento se describe una molécula de unión que comprende o que consiste en un dominio V_H tal como se muestra en SEQ ID NO. 288 o una variante del mismo que tiene las siguientes sustituciones en comparación con SEQ ID NO. 288: el residuo 23 es A, el residuo 28 es N, el residuo 29 es A o L, el residuo 31 es A o D, el residuo 33 es H, el residuo 34 es I o L, el residuo 35 es N, el residuo 50 es S, el residuo 52 es K, el residuo 55 es T, el residuo 57 es A o T, el residuo 58 es K, el residuo 62 es R, el residuo 63 es E, el residuo 65 es E, el residuo 50 es I o T, el residuo 99 es L, el residuo 103 es T, Q, el residuo 104 es R, F o W, el residuo 105 es Y, S o D, el residuo 106 es P o F, el residuo 107 es H, N o G, el residuo 108 es D o S y/o el residuo 110 es Y o A o W.

Las moléculas de unión de la familia 3 o similares a las de la familia 3 tienen valores de K_D , K_{off} , K_A , K_d y CI_{50} tal como se describe adicionalmente en el presente documento y tal como se muestra en los ejemplos.

En el presente documento se describe una molécula de unión capaz de unirse a IL-17A humana que comprende un dominio V_H humano que comprende una secuencia de la familia 4 o similar a la de la familia 4.

En un ejemplo, la molécula de unión comprende o consiste en al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina dirigido contra IL-17A, preferiblemente IL-17A humana, siendo dicho dominio un dominio V_H humano y comprendiendo dicha molécula de unión a IL-17A una secuencia de la familia 4 o similar a la de la familia 4. Estas incluyen la secuencia de clon parental (4.1; SEQ ID NO. 288) tal como se muestra en la Figura 4 o una parte de la misma, por ejemplo, una secuencia de CDR3, y secuencias de V_H de clones o partes de las mismas que se derivan del clon parental 4 a través de un proceso de optimización, por ejemplo, tal como se muestra en la Figura 4. Las secuencias de CDR y las secuencias de longitud completa de clones en la familia 4 se enumeran según la tabla 4 tal como se muestra a continuación.

Tabla 4 Secuencias de CDR y secuencias de V_H de la familia 4. Secuencias correspondientes se muestran en la figura 4.

Clon	CDR1	CDR2	CDR3	Longitud completa
4,1	SEQ ID NO. 341	SEQ ID NO. 342	SEQ ID NO. 343	SEQ ID NO. 344

En el presente documento se describe una molécula de unión de la familia 4 o similar a la de la familia 4 que comprende un dominio V_H humano que comprende una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO. 343 o una secuencia que tiene al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con SEQ ID NO. 343.

En un ejemplo, la molécula de unión de la familia 4 o similar a la de la familia 4 comprende al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina dirigido contra IL-17A, siendo dicho dominio un dominio V_H humano y comprendiendo dicho dominio V_H humano al menos un sitio de unión a antígeno que comprende una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO. 343 o una secuencia que tiene al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con SEQ ID NO. 343.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 4 o similar a la de la familia 4 comprende una molécula de unión que comprende o que consiste en al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina dirigido contra IL-17A, siendo dicho dominio un dominio V_H humano y comprendiendo dicha molécula de unión a IL-17A al menos un sitio de unión a antígeno que comprende regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, comprendiendo o consistiendo dicha CDR1 en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 341 o una secuencia con al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% de homología con la misma, comprendiendo o consistiendo dicha CDR2 en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 342 o una secuencia con al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con la misma, y comprendiendo o consistiendo dicha CDR3 en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 343, o una secuencia con al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con la misma.

En un ejemplo, dicha CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 341 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 342 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 343 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 4 o similar a la de la familia 4 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 344 o una secuencia con al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. Las secuencias de CDR de tales secuencias se listan más adelante. En un ejemplo, la homología es de al menos el 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Por ejemplo, el dominio V_H comprende una secuencia tal como se muestra anteriormente, pero comprende una o más sustituciones de aminoácido, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácido. En un ejemplo, la una o más sustituciones de aminoácido están en una o más de las áreas de entramado. Por ejemplo, la una o más sustituciones de aminoácido están en una o más de las CDR. En un ejemplo, las sustituciones de aminoácido están en las secuencias de entramado y de CDR. En un ejemplo, el dominio V_H comprende o consiste en SEQ ID NO. 344 o una secuencia que comprende una o más sustituciones de aminoácido, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácido.

Las moléculas de unión de la familia 4 o similares a las de la familia 4 tienen valores de K_D, K_{off}, K_A, K_d y C_{l50} tal como se describe adicionalmente en el presente documento y tal como se muestra en los ejemplos.

En el presente documento se describe una molécula de unión capaz de unirse a IL-17A humana que comprende un dominio V_H humano que comprende una secuencia de la familia 5 o similar a la de la familia 5.

En el presente documento se describe una molécula de unión comprende o consiste en al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina dirigido contra IL-17A, preferiblemente IL-17A humana, siendo dicho dominio un dominio V_H humano y siendo dicha secuencia de la familia 5 o similar a la de la familia 5 de unión a IL-17. Estas incluyen la secuencia de clon parental (5.1; SEQ ID NO. 348) tal como se muestra en la Figura 5 o una parte de la misma y secuencias de clones que se derivan/pueden derivarse del clon parental 5 o una parte del mismo, por ejemplo, una secuencia de CDR3, y secuencias de V_H de clones o partes de los mismos que se derivan del clon parental 5 a través de un proceso de optimización, por ejemplo, tal como se muestra en la Figura 5. Las secuencias de CDR y las secuencias de longitud completa de clones en la familia 5 se enumeran según la tabla 5 tal como se muestra a continuación.

Tabla 5: Secuencias de CDR y secuencias de V_H de la familia 5. Secuencias correspondientes se muestran en figura 5.

Clon	SEQ ID NO. de CDR1	SEQ ID NO. de CDR2	SEQ ID NO. de CDR3	SEQ ID NO. de V _H de longitud completa
5,1	SEQ ID NO. 345	SEQ ID NO. 346	SEQ ID NO. 347	SEQ ID NO. 348

En un ejemplo, la molécula de unión de la familia 5 o similar a la de la familia 5 comprende un dominio V_H humano que comprende una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO. 287 o una secuencia que tiene al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con SEQ ID NO. 347.

En un ejemplo, la molécula de unión de la familia 5 o similar a la de la familia 5 comprende al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina dirigido contra IL-17A, siendo dicho dominio un dominio V_H humano y comprendiendo dicho dominio V_H humano al menos un sitio de unión a antígeno que comprende una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO. 347 o una secuencia que tiene al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con SEQ ID NO. 287.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 5 o similar a la de la familia 5 comprende una molécula de unión que comprende o que consiste en al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina dirigido contra IL-17A, siendo dicho dominio un dominio V_H humano y comprendiendo dicha molécula de unión a IL-17A al menos un sitio de unión a antígeno que comprende regiones hipervariables CDR1, CDR2 y CDR3, comprendiendo o consistiendo dicha CDR1 en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 345 o una secuencia con al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con la misma, comprendiendo o consistiendo dicha CDR2 en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 345 o una secuencia con al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con la misma, y comprendiendo o consistiendo dicha CDR3 en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 347, o una secuencia con al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con la misma.

En un ejemplo, dicha CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 345 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 86%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 346 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 347 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 5 o similar a la de la familia 5 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 348 o una secuencia con al menos el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80% o el 90% de homología con la misma. En un ejemplo, la homología es de al menos el 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99%. Las secuencias de CDR de tales secuencias se listan más adelante. Por ejemplo, el dominio V_H comprende SEQ ID NO. 348, pero comprende una o más sustituciones de aminoácido, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácido. En un ejemplo, la una o más sustituciones de aminoácido están en una o más de las áreas de entramado. Por ejemplo, la una o más sustituciones de aminoácido están en una o más de las CDR.

Las moléculas de unión de la familia 5 o similares a las de la familia 5 tienen valores de KD, Koff, KA, Kd y Cl₅₀ tal como se describe adicionalmente en el presente documento y tal como se muestra en los ejemplos.

Una molécula de unión puede comprender una secuencia de CDR3 seleccionada de una secuencia de CDR3 de la familia 1 o similar a la de la familia 1, una de la familia 2 o similar a la de la familia 2, una de la familia 3 o similar a la de la familia 3, una de la familia 4 o similar a la de la familia 4 o una de la familia 5 o similar a la de la familia 5 combinada con una secuencia de CDR1 y/o CDR2 de otra familia listada en el presente documento.

Por ejemplo, la molécula de unión puede comprender una secuencia de CDR3 de la familia 1 o similar a la de la familia 1, por ejemplo, tal como se muestra en la figura 1, combinada con una secuencia de CDR1 y/o CDR2 de una o dos de otras familias tal como se muestra en la tabla 2, 3, 4 o 5.

Por ejemplo, la molécula de unión puede comprender una secuencia de CDR3 de la familia 2 o similar a la de la familia 2, por ejemplo, tal como se muestra en la figura 2, combinada con una secuencia de CDR1 y/o CDR2 de una o dos de otras familias tal como se muestra en la tabla 1, 3, 4 o 5. Son posibles diversas combinaciones tal como apreciará un experto en la técnica.

Por ejemplo, la molécula de unión puede comprender una secuencia de CDR3 de la familia 3 o similar a la de la familia 3, por ejemplo, tal como se muestra en la figura 3, combinada con una secuencia de CDR1 y/o CDR2 de una o dos de otras familias tal como se muestra en la tabla 1, 2, 4 o 5. Son posibles diversas combinaciones tal como apreciará un experto en la técnica.

Por ejemplo, la molécula de unión puede comprender una secuencia de CDR3 de la familia 4 o similar a la de la familia 4, por ejemplo, tal como se muestra en la figura 4, combinada con una secuencia de CDR1 y/o CDR2 de una o dos de otras familias tal como se muestra en la tabla 1, 2, 3, o 5. Son posibles diversas combinaciones tal como apreciará un experto en la técnica.

Por ejemplo, la molécula de unión puede comprender una secuencia de CDR3 de la familia 5 o similar a la de la familia 5, por ejemplo, tal como se muestra en la figura 5, combinada con una secuencia de CDR1 y/o CDR2 de una o dos de otras familias tal como se muestra en la tabla 1, 2, 3 o 4. Son posibles diversas combinaciones tal como apreciará un experto en la técnica.

Una molécula de unión descrita en el presente documento puede proporcionarse como proteína de fusión con uno o más restos de proteína adicionales. Por ejemplo, la molécula de unión descrita en el presente documento puede proporcionarse como fusión con un segundo resto.

El segundo resto puede comprender un dominio V_H que es también específico para IL-17A humana, proporcionando así una molécula de unión bivalente. En un ejemplo, la molécula de unión es biparatópica. Las moléculas de unión biparatópicas se unen a diferentes epítomos. Las moléculas de unión biparatópicas pueden construirse usando métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, para generar una molécula de unión bivalente, una molécula de unión de la familia 1 o similar a la de la familia 1 puede ligarse a una molécula de unión de la familia 2, 3, 4 o 5 o similar a una de la familia 2, 3, 4 o 5. Esto se ilustra adicionalmente en los ejemplos y en las figuras 29-33. Tal como se describe en el presente documento, un V_H tal como se define para el clon 1.2 está conectado a otro V_H de la familia 2 o familia 3, por ejemplo, al V_H tal como se define para el clon 3.2. Dos o más V_H están conectados mediante un ligador, por ejemplo, un ligador polipeptídico. Ligadores adecuados, por ejemplo, que comprenden un ligador que incluye residuos GS tales como $(Gly_4Ser)_n$, donde n =desde 1 hasta 10, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

En el presente documento se describen las siguientes moléculas de unión biparatópicas 3.2-2(G_4S)-1.2, 3.2-6(G_4S)-1.2, 3.2-4(G_4S)-1.2. Por tanto, en el presente documento se describe una molécula de unión que comprende SEQ ID No. 430, 432, 434 o 436 y ácidos nucleicos que codifican una molécula de unión de este tipo.

Por ejemplo, el segundo resto comprende un dominio V_H u otro fragmento de anticuerpo que es específico para un antígeno diferente para proporcionar una molécula de unión biespecífica. Por tanto, tal como se usa en el presente documento, el término "molécula de unión biespecífica" se refiere a un polipéptido que comprende una molécula de unión tal como se describe en el presente documento que tiene un sitio de unión que tiene especificidad de unión para IL-17A, y un segundo dominio polipeptídico que tiene un sitio de unión que tiene especificidad de unión para una segunda diana, es decir, el agente tiene especificidad para dos dianas. La primera diana y la segunda diana no son la misma, es decir son dianas diferentes, por ejemplo, proteínas, pero ambas están presentes en una célula. Por consiguiente, un agente polipeptídico biespecífico tal como se describe en el presente documento puede unirse selectiva y específicamente a una célula que expresa (o presenta en su superficie celular) la primera diana y la segunda diana. Por ejemplo, la molécula de unión comprende más de dos restos de proteína.

Por ejemplo, más de dos restos están unidos entre sí proporcionando una molécula de unión multiespecífica. Un agente polipeptídico multiespecífico tal como se describe en el presente documento puede además unirse a una o más dianas adicionales, es decir, un polipéptido multiespecífico puede unirse a al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o más dianas, teniendo el agente polipeptídico multiespecífico al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o más sitios de unión a diana respectivamente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "diana" se refiere a una molécula biológica (por ejemplo, péptido, polipéptido, proteína, lípido, carbohidrato) a la que un dominio polipeptídico que tiene un sitio de unión puede unirse selectivamente. La diana puede ser, por ejemplo, una diana intracelular (por ejemplo, una diana proteica intracelular) o una diana de la superficie celular (por ejemplo, una proteína de membrana, una proteína de receptor). Preferiblemente, una diana es una diana de la superficie celular, tal como una proteína de la superficie celular. Preferiblemente, la primera diana de la superficie celular y la segunda diana de la superficie celular están ambas presentes en una célula.

Los anticuerpos multiespecíficos pueden construirse usando métodos conocidos en la técnica.

En las moléculas de unión biparatópicas o multiespecíficas, los restos están unidos generalmente mediante un ligador, por ejemplo, un ligador polipeptídico. Ligadores adecuados, por ejemplo, que comprenden un ligador que incluye residuos GS tal como $(Gly_4Ser)_n$, donde n =desde 1 hasta 10, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, se conocen en la técnica.

Si se desea, las moléculas de unión biespecíficas o multiespecíficas pueden estar ligadas a una región Fc de anticuerpo o un fragmento de la misma, que comprende uno o ambos de los dominios C_H2 y C_H3 , y opcionalmente una región bisagra. Por ejemplo, vectores que codifican moléculas de unión biespecíficas o multiespecíficas ligadas

como una única secuencia de nucleótidos a una región Fc o un fragmento de la misma pueden usarse para preparar tales polipéptidos.

Las segundas dianas de antígeno a modo de ejemplo incluyen receptores de leucocitos, por ejemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD4, CD45, CD58, CD80, CD86 o sus ligandos; TNF, IL-1 IL-15, IL-23, IL-6 o CD20. Esta lista no está limitada a los agentes mencionados.

En un ejemplo, un segundo (o tercer, cuarto, quinto, etc.) resto puede servir para prolongar la semivida de la molécula de unión. El segundo o tercer resto puede comprender una proteína, por ejemplo, un anticuerpo, o parte del mismo que se une a una albúmina sérica, por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA). El segundo resto puede comprender un dominio V_H que se une a albúmina sérica, por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA).

El segundo resto puede comprender una albúmina sérica, por ejemplo, una albúmina sérica humana (HSA) o una variante de la misma tal como C34S. Se proporciona además una molécula de unión tal como se describe en el presente documento que comprende un dominio V_H y un dominio Fc o un fragmento del mismo, por ejemplo, estando conectado el dominio V_H a un dominio Fc o un fragmento del mismo. Se proporciona además una molécula de unión que comprende un segundo dominio variable que se une específicamente a un segundo antígeno, siendo el segundo antígeno un antígeno distinto de IL-17A humana. El segundo antígeno puede ser un agrupamiento de molécula de diferenciación (CD) o una molécula de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II.

En el presente documento se describe un ácido nucleico aislado que codifica un elemento de unión. El ácido nucleico puede incluir ADN y/o ARN. En el presente documento se describe un ácido nucleico aislado que codifica para una CDR, un conjunto de CDR, un dominio V_H o una molécula de unión tal como se definieron anteriormente. En el presente documento se describen secuencias de ácido nucleico que comprenden o que consisten en SEQ ID NOs. 349 a 410 que codifican dominios V_H de la familia 1, comprendiendo o consistiendo dicho dominio V_H en SEQ ID NO. 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 216, 220, 224, 228, 232, 236, 240, 244 o 248 440, 444, 448, 452, 456, 460 o 464 respectivamente.

Ejemplos de tales ácidos nucleicos se muestran a continuación.

SEQ ID No. 349 ácido nucleico que codifica V_H 1.1

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGTTATTCGATGTACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGATG
GAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA
CAACGCCAAGAAGTCACTGTTTCTGCAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACACG
GCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCCACTTTGACTACTGGG
GCCAGGGAACCTGGTCACTGTCTCCTCA

SEQ ID No. 350 ácido nucleico que codifica V_H 1.2

GAGGTTTCAGTTGGTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTCCAGCCGGGTGGTAGCCT
GCGCCTGTCCTGCGCGGCTAGCGGTTTCACGTTTAGCAGCTACAGCATGTACTG
GGTGCGTCAAGCGCCAGGCAAAGGTCTGGAATGGGTTGCCGAGATTAAGCAAGA
CGGTTCTGTTTCAGTATTATGTCAGCGACGTGAAGGGTCGTTTTACCATCAGCCGT
GACAACGCGAAAAACAGCCTGTATTTGCAGATGAATCCCTGCGCGCTGAAGATA
CCGCGGTGTATTACTGTGCGAAAGGTGAGATTCTGCCGCTGTACTTCGATTACTG
GGGCCAAGGCACCCTGGTTACTGTCTCGAGC

SEQ ID No. 351 ácido nucleico que codifica V_H 1.3

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGTTATAGCATGTACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAAGCAAGAT
GGAAGTGTGCAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
ACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACAC
GGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTGG
GGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID No. 352 ácido nucleico que codifica V_H 1.4

GAGGTTTCAGTTGGTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTCCAGCCGGGTGGTAGCCT
GCGCCTGTCCTGCGCGGCTAGCGGTTTCACGTTTAGCAGCTACAGCATGTACTG
GGTGCGTCAAGCGCCAGGCAAAGGTCTGGAATGGGTGGCCGAGATTAAGCAAAC
CGGTTCTGTTTCAGTATTATGTGACAGCGTGAAGGGTCGTTTTACCATCAGCCGT
GACAACGCGAAAAACAGCCTGTATTTGCAGATGAATCCCTGCGCGCTGAAGATA
CCGCGGTGTATTACTGTGCGAAAGGTGAGATTCTGCCGCTGTACTTCGATTACTG
GGGCCAAGGCACCCTGGTTACTGTCTCGAGC

5

SEQ ID No. 353 ácido nucleico que codifica V_H 1.5

GAGGTTTCAGTTGGTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTCCAGCCGGGTGGTAGCCT
GCGCCTGTCCTGCGCGGCTAGCGGTTTCACGTTTAGCAGCTACAGCATGTACTG
GGTGCGTCAAGCGCCAGGCAAAGGTCTGGAATGGGTGGCCGAGATTAAGCCGAC
CGGTTCTGTTTCAGTATTATGTGACAGCGTGAAGGGTCGTTTTACCATCAGCCGT
GACAACGCGAAAAACAGCCTGTATTTGCAGATGAATCCCTGCGCGCTGAAGATA
CCGCGGTGTATTACTGTGCGAAAGGTGAGATTCTGCCGCTGTACTTCGATTACTG
GGGCCAAGGCACCCTGGTTACTGTCTCGAGC

10

SEQ ID No. 354 ácido nucleico que codifica V_H 1.6

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGTTATAGCATGTACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAAGCAAGAT
GGAAGTGAAGCAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
ACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACAC
GGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTGG
GGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCCTCA

15

SEQ ID No. 355 ácido nucleico que codifica V_H 1.7

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGTTATGGGATGTACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAGATAGAGCAAGA
TGGAAGTGAGGAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA
GACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTG
GGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCCTCA

SEQ ID No. 356 ácido nucleico que codifica V_H 1.8

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGTTATGGTATGTAAGTGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAGATAGAGCAAGAT
GGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
ACAACGCCAAGAACTCACTGTTTCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACAC
GGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTGG
GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID No. 357 ácido nucleico que codifica V_H 1.9

5

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGTTATGGAATGTAAGTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAAACAAGA
TGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA
GACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTG
GGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID No. 358 ácido nucleico que codifica V_H 1.10

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGTTATCGCATGTAAGTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAGCATAGAACAAGA
TGGAAGTGAGGAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA
GACAACGCCAAGAACTCACTGTTTCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTG
GGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

10

SEQ ID No. 359 ácido nucleico que codifica V_H 1.11

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGTTATCAGATGTAAGTGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAGCATAAAACAAGATG
GAAGTGAGGAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGA
CAACGCCAAGAACTCACTGTTTCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACAG
GCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTGGG
GCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

15

SEQ ID No. 360 ácido nucleico que codifica V_H 1.12

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGTTATGGGATGTAAGTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAGATAGAGCAAGA
TGGAAGTGAGGAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA
GACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTG
GGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID No. 361 ácido nucleico que codifica V_H 1.13

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATGGGATGTA CTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAGCATAGAACAAGA
TGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA
GACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTG
GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

5 SEQ ID No. 362 ácido nucleico que codifica V_H 1.14

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATCGGATGTA CTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAGCATAGAACAAGA
TGGAAGTGAGGAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA
GACAACGCCAAGAAGTCACTGTTTCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTG
GGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

10 SEQ ID No. 363 ácido nucleico que codifica V_H 1.15

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATAGCATGTA CTGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAGGCAAGAT
GGAAGTGAGCAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
ACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACAC
GGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTGG
GGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID No. 364 ácido nucleico que codifica V_H 1.16

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATAGCATGTA CTGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAAGCAAGAT
GGAAGTGAGCAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
ACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAATGGCCTGAGAGCCGAGGACAC
GGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTGCCCCTCTACTTCGACTACTGG
15 GGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID No. 365 ácido nucleico que codifica V_H 1.17

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATAGCATGTA CTGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAAGCCAACC
GGGAGTGTGCAATACTATGTGTCCGACGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
ACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACAC
GGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTGG
GGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID No. 366 ácido nucleico que codifica V_H 1.18

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATAGCATGTACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAAGCAAGAC
GGCAGTGTGCAATACTATGTGGGGGGCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA
GACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTG
GGGCCAGGGAACCCCTGGTCACTGTCTCTTCA

5

SEQ ID No. 367 ácido nucleico que codifica V_H 1.19

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAACCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATGGAATGTACTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAAACAAGAT
GGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
ACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACAC
GGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTGG
GGCCAGGGAACCCCTGGTCACTGTCTCTTCA

10

SEQ ID No. 368 ácido nucleico que codifica V_H 1.20

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATGGGATGTACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAGATAGAGCAAGA
TGGAAGTGAGGAATACTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA
GACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTG
GGGCCAGGGAACCCCTGGTCACTGTCTCTTCA

15

SEQ ID No. 369 ácido nucleico que codifica V_H 1.21

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCTGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCGGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATAGCATGTACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCGAGATAAAGCAAGA
TGGAAGTGAGCAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA
GACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTG
GGGCCAGGGAACCCCTGGTCACTGTCTCTTCA

SEQ ID No. 370 ácido nucleico que codifica V_H 1.22

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCGGCCTGGGGGGTCCCT
 GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATGGGATGTACTGG
 GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAGATAGAGCAAGA
 TGGAAGTGAGGAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA
 GACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACA
 CGGCCGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTG
 GGGCCAGGGAACCCTGGTCACTGTCTCTTCA

En el presente documento se describen secuencias de ácido nucleico que comprenden una secuencia, por ejemplo, SEQ ID NO. 371, que codifica un dominio V_H de la familia 2, comprendiendo o consistiendo dicho dominio V_H en SEQ ID NO. 252, 256, 260, 264, 268, 272, 276, 280 o 284.

SEQ ID No. 371 ácido nucleico que codifica V_H 2.1

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
 GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCTATGGGATGGGCTGG
 GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAAATAAAACAAGAT
 GGAAGTGAGAAAGACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
 ACAACGCCAAGAAGTCACTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC
 GGCTGTGTATTATTGTGCGAGAGAGAGTATATTTGGAATCCCCGAGGACTGGGGC
 CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTCTCA

En el presente documento se describen secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, que comprenden una secuencia seleccionada de SEQ ID NO. 372 a 381, que codifican dominios V_H de la familia 3, comprendiendo o consistiendo dicho dominio V_H en SEQ ID NO. 288, 292, 296, 300, 304, 308, 312, 316, 320, 324, 328, 332, 336 o 340.

SEQ ID No. 372 ácido nucleico que codifica V_H 3.1

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGT
 GAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGG
 GTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAAC
 AGTGGTGGCACAACCTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGG
 GACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGAC
 ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTATGGATCGGGATTATTATGATACTAGTGGTTA
 CTTTGGCTGGTTCGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCA

SEQ ID No. 373 ácido nucleico que codifica V_H 3.2

CAGGTTCACTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTAAAGAAGCCTGGGGCCTCGGTG
 AAGGTCTCCTGTAAGGCTTCCGGATATAACGCGGACGCCTATTATATAAATTGGGT
 GCGACAGGCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGATGGGAAGTATCAAGCCTAATAC
 CGGTGCCACAAAATATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGAGTCACCATAACCAGGGAC
 ACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACG
 GCCGTGTATTACTGTGCGAGTCTGGATCGGGATACGTGGTACCCGCACTCCTACG
 CGGGGTGGTTCGACGCGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCA

SEQ ID No. 374 ácido que codifica V_H 3.3

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGT
GAAGGTCTCCTGCGCAGCTTCCGGATACACCTTCACCGACTACTATCTGCACTGG
GTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGGTGGATCAACCCTAAC
ACTGGCACCACAAAGTATGCACGGGAGTTTGAGGGCAGAGTCACCATGACCAGG
GACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTATGGATCGGGATTATTATGATACTAGTGTTA
CTTTGGCTGGTTCGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCA

SEQ ID No. 375 ácido nucleico que codifica V_H 3.5

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGT
GAAGGTCTCCTGCGCAGCTTCCGGATACACCTTCACCGACTACTATCTGCACTGG
GTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGGTGGATCAACCCTAAC
ACTGGCACCACAAAGTATGCACGGGAGTTTGAGGGCAGAGTCACCATGACCAGG
GACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTCTGGATCGGGATTGGCGCTCGCCCAACGAC
TACTTTGGCTGGTTCGACTCGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCA

5

SEQ ID No. 376 ácido nucleico que codifica V_H 3.6

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGT
GAAGGTCTCCTGCGCAGCTTCCGGATACACCTTCACCGACTACTATCTGCACTGG
GTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGGTGGATCAACCCTAAC
ACTGGCACCACAAAGTATGCACGGGAGTTTGAGGGCAGAGTCACCATGACCAGG
GACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTCTGGATCGGGATTGGCGCTCGCCCAACGAC
TACTACGGGTGGTTCGACTCGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCA

10

SEQ ID No. 377 ácido nucleico que codifica V_H 3.9

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGT
GAAGGTCTCCTGTAAGGCTTCCGGATATAACTTCGACGCCTATCATATAAATTGGG
TGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAAGTATCAAGCCTAATA
GTGGTGCCACAAAATATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGAGTCACCATAACCAGGGA
CACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACAC
GGCCGTGTATTACTGTGCGAGTATGGATCGGGATTACTATGATACTAGTGTTACT
TTGGCTGGTTCGACTCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCA

15

SEQ ID No. 378 ácido nucleico que codifica V_H 3.11

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGT
GAAGGTCTCCTGTAAGGCTTCCGGATATAACTTCGACGCCTATCATATAAATTGGG
TGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGATGGGAAGTATCAAGCCTAATA
GTGGTGCCACAAAATATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGAGTCACCATAACCAGGGA
CACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACAC
GGCCGTGTATTACTGTGCGAGTCTGGATCGGGATACGTGGTACCCGCACTCCTAC
TTTGGCTGGTTCGACTCGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCA

SEQ ID No. 379 ácido nucleico que codifica V_H 3.13

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGT
 GAAGGTCTCCTGTAAGGCTTCCGGATATAACTTCGACGCCTATCATATAAATTGGG
 TGCGACAGGCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGATGGGAAGTATCAAGCCTAATA
 GTGGTGCCACAAAATATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGAGTCACCATAACCAGGGA
 CACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACAC
 GGCCGTGTATTACTGTGCGAGTCTGGATCGGGATACGTGGTACCCGCACTCCTAC
 GCGGGGTGGTTCGACTCGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCA

- 5 En el presente documento se describen secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, que comprenden la secuencia SEQ ID NO. 380 que codifica dominios V_H de la familia 4, comprendiendo o consistiendo dicho dominio V_H en SEQ ID NO. 344.

SEQ ID No. 380 ácido nucleico que codifica V_H 4.1

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
 GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCTATTGGATGAACTGG
 GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGGTGGCCACCATAAAACAAGAT
 GGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
 ACAACGCCACGAACTCACTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC
 GGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGGAGATACGATTTTCGACGGTGCTTTTGATATC
 10 TGGGGCCAAGGGACAATGGTCACTGTCTCCTCA

En el presente documento se describen secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, que comprenden la secuencia SEQ ID NO. 381 que codifica un dominio V_H de la familia 5, comprendiendo o consistiendo dicho dominio V_H en SEQ ID NO. 348.

15 SEQ ID No. 381 ácido nucleico que codifica V_H 5.1

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
 GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCTATTGGATGAGCTGG
 GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAACATAAAGCAAGAT
 GGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAG
 ACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC
 GGCTGTGTATTACTGTGCGCATCAGTGGCCCTTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGG
 ACAATGGTCACTGTCTCCTCA

- 20 El ácido nucleico puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético o producirse de manera recombinante. La referencia a una secuencia de nucleótidos tal como se expone en el presente documento abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada, y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que U está sustituido por T, a menos que el contexto requiera lo contrario.

- 25 Además, en el presente documento se describe un constructo de ácido nucleico que comprende al menos un ácido nucleico definido anteriormente. El constructo puede estar en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o de expresión.

En el presente documento se describe una célula huésped recombinante aislada que comprende uno o más constructos de ácido nucleico tal como anteriormente.

- 30 En el presente documento se describe un agente de unión capaz de unirse a IL-17A que compite por la unión a IL-17A con una molécula de unión tal como se describió anteriormente en un ensayo competitivo.

Las moléculas de unión de la invención tiene ciertas propiedades funcionales tal como se describe más adelante.

- 35 En particular, las moléculas de unión de la invención bloquean los efectos de IL-17A sobre sus células diana y por tanto están indicadas para su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por IL-17A, por ejemplo, tal como se

describe en el presente documento. Estas y otras actividades farmacológicas de las moléculas de unión de la invención pueden demostrarse en métodos de prueba estándar, por ejemplo, tal como se describe en la técnica: Neutralization of IL-17A dependent production of interleukin-6 by primary human fibroblasts: The production of IL-6 in primary human (dermal) fibroblasts is dependent on IL-17 (Hwang SY *et al.*, (2004) Arthritis Res Ther; 6:R120-128)) y en los ejemplos en el presente documento. Por tanto, tal como se describe en más detalle en los ejemplos, los elementos de unión según la invención neutralizan IL-17A con alta potencia. Por tanto, el término "neutralizante" se refiere a la neutralización de una actividad biológica de IL-17 cuando una proteína de unión se une específicamente a IL-17. La inhibición de una actividad biológica de IL-17 mediante una proteína de unión neutralizante puede evaluarse midiendo uno o más indicadores de actividad biológica de IL-17 ampliamente conocidos en la técnica, tal como se describe en los ejemplos.

Por ejemplo, la neutralización de la unión de IL-17A a su receptor puede medirse como liberación celular de una molécula biológica, por ejemplo, MMP13, PGE2 o una citocina tal como IL-6 o IL-8, en un ensayo biológico, dado que la unión de IL-17A a su receptor induce la liberación celular de estas moléculas, lo que puede determinarse usando ensayos apropiados, por ejemplo, en células HT1080, condrocitos u otros tipos de célula o tejido adecuados.

La inhibición de la actividad biológica puede ser parcial o total. En ejemplos específicos, se proporcionan elementos de unión que inhiben la actividad biológica de IL-17A en al menos el 95%, al menos el 90%, al menos el 85%, al menos el 80%, al menos el 75%, al menos el 70%, al menos el 60% o al menos el 50% de la actividad en ausencia del elemento de unión. El grado en el que un elemento de unión neutraliza IL-17A se denomina su potencia neutralizante. La potencia puede determinarse o medirse usando uno o más ensayos conocidos por el experto en la técnica y/o tal como se describe o se hace referencia en el presente documento. Por ejemplo, la potencia puede someterse a ensayo en:

- ensayo de unión receptor-ligando con HTRF(R) (fluorescencia resuelta en el tiempo homogénea)
- ensayo de células HT1080 usando la liberación de IL-6 sinergizada en respuesta a IL-17 y TNF α
- ensayo de liberación de IL-6/IL-8/MMP13/PGE2 de condrocitos, ensayo de liberación de IL-6 en explantes de cartílago
- ensayo de liberación de IL-6 en fibroblastos sinoviales (por ejemplo, de pacientes con RA o OA), por ejemplo, usando la respuesta de IL-6 sinergizada a IL-17 y TNF α .

Los métodos de ensayo se describen en detalle en los ejemplos.

La potencia neutralizante de un elemento de unión tal como se calcula en un ensayo usando IL-17A de una primera especie (por ejemplo, humano) puede compararse con la potencia neutralizante del elemento de unión en el mismo ensayo usando IL-17 de una segunda especie (por ejemplo, macaco cangrejero), con el fin de evaluar el grado de reactividad cruzada del elemento de unión para IL-17 de las dos especies.

La potencia se expresa normalmente como valor de CI_{50} , en nM a menos que se establezca lo contrario. En ensayos funcionales, CI_{50} es la concentración de un elemento de unión que reduce una respuesta biológica en el 50% de su máximo. La CI_{50} puede calcularse representando gráficamente el % de respuesta biológica máxima como una función del log de la concentración de elemento de unión, y usando un programa de software para ajustar una función sigmoidea a los datos para generar valores de CI_{50} .

Por tanto, la presente divulgación se refiere a una molécula de unión que comprende al menos un dominio V_H dirigido contra IL-17A humana, o que comprende o que consiste en al menos un anticuerpo de dominio V_H único de inmunoglobulina, teniendo dicho dominio V_H una CI_{50} para la inhibición de la producción de IL-6 de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1000 nM o más, por ejemplo, de 0,2 a 900, de 0,2 a 800, de 0,2 a 700, de 0,2 a 600, de 0,2 a 500, de 0,2 a 400, de 0,2 a 300, de 0,2 a 200, de 0,2 a 100, de 0,2 a 50, de 0,2 a 40, de 0,2 a 30, de 0,2 a 20, de 0,2 a 10, de 0,2 a 9, de 0,2 a 8, de 0,2 a 7, de 0,2 a 6, de 0,2 a 5, de 0,2 a 4,0, de 0,2 a 3, de 0,2 a 2 o de 0,2 a 1 cuando se somete a prueba tal como se describe en los ejemplos, es decir midiendo la capacidad del V_H que se une a IL-17 de inhibir la liberación de IL-6 inducida por IL-17 a partir de la línea celular HT1080. Por ejemplo, las moléculas de unión pueden tener normalmente una CI_{50} para inhibición de la producción de IL-6 de aproximadamente 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4 3,5, 3, 6, 3,7, 3, 8, 3,9 o 4,0 nM. Las moléculas de unión pueden tener una CI_{50} para la inhibición de la producción de IL-6 de menos de aproximadamente 4 nM, preferiblemente menos de aproximadamente 2 nM evaluada midiendo la capacidad de V_H que se une a IL-17 de inhibir la liberación de IL-6 inducida por IL-17 a partir de la línea celular HT1080. Este ensayo mide la liberación de IL-6 en respuesta a y un método detallado se facilita en los ejemplos. La molécula de unión, por ejemplo, un dominio V_H , que tiene estas características de unión puede seleccionarse de una de las secuencias dadas a conocer en el presente documento. Por ejemplo, el dominio V_H comprende una secuencia de CDR3 o secuencia de V_H tal como se describe en el presente documento.

Por ejemplo, en un ejemplo, dicha molécula de unión a IL-17A comprende una secuencia similar a la de la familia 1 que tiene una CI_{50} para la inhibición de la producción de IL-6 de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 13, por ejemplo, de 0,2 a 4,0 nM cuando se somete a prueba tal como se describe en los ejemplos, es decir midiendo la capacidad de V_H que se une a IL-17 de inhibir la liberación de IL-6 inducida por IL-17 a partir de la línea celular HT1080.

Las moléculas de unión pueden tener una CI_{50} para la inhibición de la producción de IL-6 de menos de aproximadamente 13, preferiblemente menos de aproximadamente 10, 9, 8, 7, 6 o 4 nM, preferiblemente menos de aproximadamente 2 nM. En un ejemplo, la CI_{50} es de 0,2-2,0 nM, por ejemplo, 0,2-1,0 nM, por ejemplo, aproximadamente 0,4 nM. En un ejemplo, la CI_{50} es tal como se muestra en los ejemplos.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 1 o similar a la de la familia 1 comprende secuencia de CDR3 SEQ ID NO. 3, o una secuencia con al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 3 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101, 105, 109, 113, 117, 121, 125, 129, 133, 137, 141, 145, 149, 153, 157, 161, 165, 169, 173, 177, 181, 185, 189, 193, 197, 201, 205, 209, 213, 217, 221, 225, 229, 233, 237, 241, 245, 438, 442, 446, 450, 454, 458 o 462, CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142, 146, 150, 154, 158, 162, 166, 170, 174, 178, 182, 186, 190, 194, 198, 202, 206, 210, 214, 218, 222, 226, 230, 234, 238, 242, 246, 439, 443, 447, 451, 455, 459, 463 y CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83, 87, 91, 95, 99, 103, 107, 111, 115, 119, 123, 127, 131, 135, 139, 143, 147, 151, 155, 159, 163, 167, 171, 175, 179, 183, 187, 191, 195, 199, 203, 207, 211, 215, 219, 223, 227, 231, 235, 239, 243, 247, 440, 444, 448, 452, 456, 460 o 464.

En un ejemplo, la molécula de unión tiene combinaciones de CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestra para los clones 1.1 a 1.69 en la figura 1. En un ejemplo, la molécula de unión tiene una combinación de una CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestra para los clones 1.1 a 1.22 en la figura 1.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 1 o similar a la de la familia 1 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 4 o una secuencia con al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 86%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. Ejemplos se muestran en la figura 1. En un ejemplo, el dominio V_H comprende o consiste en SEQ ID NO. 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 216, 220, 224, 228, 232, 236, 240, 244, 248, 441, 445, 449, 453, 457, 461 o 466.

Por ejemplo, dicha molécula de unión a IL-17 comprende una secuencia de la familia 2 o similar a la de la familia 2. En un ejemplo, dicha similar a la familia 2 tiene una CI_{50} para la inhibición de la producción de IL-6 de aproximadamente 9 nM o menos cuando se somete a prueba tal como se describe en los ejemplos, es decir, midiendo la capacidad de una molécula de unión a IL-17 que comprende un V_H de inhibir la liberación de IL-6 inducida por IL-17 a partir de la línea celular HT1080.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 2 o similar a la de la familia 2 comprende la secuencia de CDR3 SEQ ID NO. 251 o una secuencia con al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 251 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, dicha CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 249 o una secuencia con al menos el 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 250 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 249, 253, 257, 261, 265, 269, 273, 277 o 281, CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 250, 254, 258, 262, 266, 270, 274, 278 o 282 y CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 251, 255, 259, 263, 267, 271, 275, 279 o 283.

En un ejemplo, la molécula de unión tiene una combinación de una CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestra para los clones 2.1 a 2.9 en la Figura 2.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 2 o similar a la de la familia 2 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 252 o una secuencia con al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. Ejemplos se muestran en la tabla 2. En un ejemplo, la secuencia de la familia 2 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 256, 260, 264, 268, 272, 276, 280 o 284.

Por ejemplo, dicha molécula de unión a IL-17A comprende una secuencia similar a la de la familia 3 que tiene una CI₅₀ para la inhibición de la producción de IL-6 de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1000 nM, por ejemplo, de 0,2 a 200 cuando se somete a prueba tal como se describe en los ejemplos, es decir midiendo la capacidad de una molécula de unión a IL-17 que comprende un V_H de inhibir la liberación de IL-6 inducida por IL-17 a partir de la línea celular HT1080. Las moléculas de unión pueden tener una CI₅₀ para la inhibición de la producción de IL-6 de menos de aproximadamente 200 nM, preferiblemente menos de aproximadamente 100 nM, preferiblemente menos de aproximadamente 10 nM evaluada midiendo la capacidad de V_H que se une a IL-17 de inhibir la liberación de IL-6 inducida por IL-17 a partir de la línea celular HT1080. En un ejemplo, la CI₅₀ es de 0,2-2,5 nM.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 3 o similar a la de la familia 3 comprende la secuencia de CDR3 SEQ ID NO. 287 o una secuencia con al menos el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 287 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, dicha CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 285 o una secuencia con al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 286 o una secuencia con al menos el 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 285, 289, 293, 297, 301, 305, 309, 313, 317, 321, 325, 329, 333 o 337, CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos 286, 290, 294, 298, 302, 306, 310, 314, 318, 322, 326, 330, 334 o 338 y CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos 287, 291, 295, 299, 303, 307, 311, 315, 319, 323, 327, 335 o 339.

En un ejemplo, la molécula de unión tiene una combinación de una CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestra para los clones 3.1 a 3.14 en la Figura 3.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 3 o similar a la de la familia 3 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 288 o una secuencia con al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 86%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de homología con la misma. Las secuencias de CDR de tales secuencias se muestran en la Figura 3. Por ejemplo, el dominio V_H comprende o consiste en SEQ ID NO. 292, 296, 300, 304, 308, 312, 316, 320, 324, 328, 332, 336 o 340.

Por ejemplo, la presente divulgación se refiere también a una molécula de unión que comprende al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina dirigido contra IL-17A, siendo dicho dominio un dominio V_H humano y comprendiendo dicha molécula de unión a IL-17A una secuencia de la familia 4 o similar a la de la familia 4.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 4 o similar a la de la familia 4 comprende la secuencia de CDR3 SEQ ID NO. 343, o una secuencia con al menos el 70%, 80%, 85%, 90%, 95% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 343 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, dicha CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 341 o una secuencia con al menos el 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 342 o una secuencia con al menos el 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 4 o similar a la de la familia 4 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 344 o una secuencia con al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. Ejemplos se muestran en la figura 4.

Por ejemplo, dicha molécula de unión a IL-17A comprende una secuencia de la familia 5 o similar a la de la familia 5.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 5 o similar a la de la familia 5 comprende la secuencia de CDR3 SEQ ID NO. 347, o una secuencia con al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha

CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 347 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, dicha CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 345 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 95%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 346 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 5 o similar a la de la familia 5 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 348 o una secuencia con al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. Ejemplos se muestran en la figura 5.

Adicionalmente, la afinidad y la cinética de unión (expresadas como la constante de disociación de equilibrio, KD) de moléculas de unión a IL-17A de la invención para la unión a IL-17A pueden determinarse, por ejemplo, usando resonancia de plasmones superficiales tal como BIAcore®, o la KD puede estimarse a partir del análisis pA2.

En el presente documento se describe una molécula de unión que tiene un valor de KD (M) de 5×10^{-9} a 1×10^{-11} , por ejemplo, de 5×10^{-9} a 2×10^{-10} , calculándose dicha KD usando BIAcore®. El término "KD" se refiere a la "constante de disociación de equilibrio" y se refiere al valor obtenido en una medición de valoración en equilibrio, o dividiendo la constante de tasa de disociación (Koff) entre la constante de tasa de asociación (Kon). En un ejemplo, la KD puede ser tal como se muestra en los ejemplos.

En un ejemplo, la molécula de unión es una secuencia de la familia 1 o similar a la de la familia 1. En un ejemplo, la secuencia de la familia 1 o similar a la de la familia 1 comprende la secuencia de CDR3 SEQ ID NO. 3, o una secuencia con al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 3 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101, 105, 109, 113, 117, 121, 125, 129, 133, 137, 141, 145, 149, 153, 157, 161, 165, 169, 173, 177, 181, 185, 189, 193, 197, 201, 205, 209, 213, 217, 221, 225, 229, 233, 237, 241, 245, 438, 442, 446, 450, 454, 458 o 462, CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 54, 58, 62, 66, 70, 74, 78, 82, 86, 90, 94, 98, 102, 106, 110, 114, 118, 122, 126, 130, 134, 138, 142, 146, 150, 154, 158, 162, 166, 170, 174, 178, 182, 186, 190, 194, 198, 202, 206, 210, 214, 218, 222, 226, 230, 234, 238, 242, 246, 439, 443, 447, 451, 455, 459, 463 y CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39, 43, 47, 51, 55, 59, 63, 67, 71, 75, 79, 83, 87, 91, 95, 99, 103, 107, 111, 115, 119, 123, 127, 131, 135, 139, 143, 147, 151, 155, 159, 163, 167, 171, 175, 179, 183, 187, 191, 195, 199, 203, 207, 211, 215, 219, 223, 227, 231, 235, 239, 243, 247, 440, 444, 448, 452, 456, 460 o 464.

En un ejemplo, la molécula de unión tiene combinaciones de CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestra para los clones 1.1 a 1.62 en la Figura 1. En un ejemplo, la molécula de unión has combinaciones de CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestra para los clones 1.1 a 1.22 en la figura 1.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 1 o similar a la de la familia 1 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 4 o una secuencia con al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. Ejemplos se muestran en la figura 1. Por ejemplo, el dominio V_H comprende o consiste en SEQ ID NO. 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104, 108, 112, 116, 120, 124, 128, 132, 136, 140, 144, 148, 152, 156, 160, 164, 168, 172, 176, 180, 184, 188, 192, 196, 200, 204, 208, 212, 216, 220, 224, 228, 232, 236, 240, 244 o 248.

En un ejemplo, la molécula de unión es una secuencia de la familia 2 o similar a la de la familia 2. En un ejemplo, la secuencia similar a la de la familia 2 comprende la secuencia de CDR3 SEQ ID NO. 251 o una secuencia con al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 251 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, dicha CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 249 o una secuencia con al menos el 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 250 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 249, 253, 257, 261, 265, 269, 273, 277 o 281, CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 250, 254, 258, 262, 266, 270, 274, 278 o 282 y CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 251, 255, 259, 263, 267, 271, 275, 279 o 283.

En un ejemplo, la molécula de unión tiene una combinación de una CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestra para los clones 2.1 a 2.9 en la Figura 2.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 2 o similar a la de la familia 2 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 252 o una secuencia con al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 96%, 95%, 97%, 98%, 99% de homología con la misma. Ejemplos se muestran en la tabla 2. En un ejemplo, la secuencia de la familia 2 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 256, 260, 264, 268, 272, 276, 280 o 284.

En un ejemplo, la molécula de unión es una secuencia similar a la de la familia 3. En un ejemplo, la secuencia de la familia 3 o similar a la de la familia 3 comprende la secuencia de CDR3 SEQ ID NO. 287 o una secuencia con al menos el 60%, el 70%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 287 o una secuencia con al menos el 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, dicha CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 285 o una secuencia con al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 286 o una secuencia con al menos el 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 285, 289, 293, 297, 301, 305, 309, 313, 317, 321, 325, 329, 333 o 337, CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos 286, 290, 294, 298, 302, 306, 310, 314, 318, 322, 326, 330, 334 o 338 y CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos 287, 291, 295, 299, 303, 307, 311, 315, 319, 323, 327, 335 o 339.

En un ejemplo, la molécula de unión tiene combinaciones de CDR1, CDR2 y CDR3 tal como se muestra para los clones 3.1 a 3.14 en la Figura 3.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 3 o similar a la de la familia 3 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 288 o una secuencia con al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. Las secuencias de CDR de tales secuencias se muestran en la Figura 3. Por ejemplo, el dominio V_H comprende o consiste en SEQ ID NO. 292, 296, 300, 304, 308, 312, 316, 320, 324, 328, 332, 336 o 340.

En un ejemplo, la molécula de unión es una secuencia de la familia 4 o similar a la de la familia 4. En un ejemplo, esta comprende la secuencia de CDR3 SEQ ID NO. 343, o una secuencia con al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 343 o una secuencia con al menos el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 86%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, dicha CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 341 o una secuencia con al menos el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 342 o una secuencia con al menos el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 4 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 344 o una secuencia con al menos el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 81%, el 82%, el 83%, el 84%, el 85%, el 87%, el 88%, el 89%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% de homología con la misma. Ejemplos se muestran en la figura 4.

Por ejemplo, dicha molécula de unión a IL-17 comprende una secuencia de la familia 5 o similar a la de la familia 5.

En una realización, la secuencia de la familia 5 o similar a la de la familia 5 comprende la secuencia de CDR3 SEQ ID NO. 347, o una secuencia con al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 347 o una secuencia con al menos

el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, dicha CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 345 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma. En un ejemplo, dicha CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 346 o una secuencia con al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de homología con la misma.

En un ejemplo, la secuencia de la familia 5 tiene un dominio V_H que comprende o consiste en SEQ ID NO. 348 o una secuencia con al menos el 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 96%, 97%, 98%, 99% de homología con la misma. Ejemplos se muestran en la figura 5.

En un ejemplo, la molécula de unión tiene una KD tal como se definió anteriormente y una CI₅₀ para la inhibición de la producción de IL-6 tal como se definió anteriormente.

En el presente documento se describe un dominio V_H aislado que comprende un producto de aminoácido de o derivado de una secuencia de línea germinal de V_H humana, por ejemplo, una secuencia de línea germinal V_H 3-07 o V_H1-02 humana.

Un experto en la técnica conocerá que hay diferentes modos para identificar y obtener las moléculas de unión a antígeno tal como se describen en el presente documento, incluyendo bibliotecas de expresión *in vitro* e *in vivo*. Esto se describe adicionalmente en los ejemplos. Pueden usarse técnicas de optimización conocidas en la técnica, tal como presentación (por ejemplo, presentación en ribosoma y/o fago) y/o mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis propensa a errores).

Los métodos para preparar o generar los polipéptidos, los ácidos nucleicos, las células huésped, los productos y las composiciones descritos en el presente documento usando bibliotecas de expresión *in vitro* pueden comprender las etapas de:

a) proporcionar un conjunto, una colección o una biblioteca de secuencias de ácido nucleico que codifica secuencias de aminoácidos; y

b) examinar dicho conjunto, colección o biblioteca para secuencias de aminoácidos que pueden unirse a/tienen afinidad para IL-17A y

c) aislar la(s) secuencia(s) de aminoácidos que pueden unirse a/tienen afinidad para IL- 17A.

En los métodos anteriores, el conjunto, la colección o la biblioteca de secuencias puede presentarse en un fago, fagémido, ribosoma o microorganismo adecuado (tal como levadura), para facilitar el examen. Métodos, técnicas y organismos huésped adecuados para presentar y examinar (un conjunto, una colección o una biblioteca de) secuencias estarán claros para el experto en la técnica (véase, por ejemplo, Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, Academic Press; 1^a edición (28 de octubre de 1996) Brian K. Kay, Jill Winter, John McCafferty).

La molécula de unión descrita en el presente documento, que incluye dominios V_H, puede expresarse en un roedor transgénico. El roedor transgénico, por ejemplo, un ratón, tiene una capacidad reducida de expresar genes de anticuerpo endógenos. Por tanto, en un ejemplo, el roedor tiene una capacidad reducida de expresar genes de anticuerpo de cadena ligera y/o pesada endógenos. Por tanto, el roedor puede comprender modificaciones adicionales para alterar la expresión de genes de anticuerpo de cadena ligera y/o pesada endógenos de modo que no se produzca ninguna cadena ligera y/o pesada funcional.

En el presente documento se describe un método para producir una molécula de unión que comprende al menos un anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina humano capaz de unirse a IL-17A humana, siendo dicho dominio un dominio V_H humano, comprendiendo dicho método

a) inmunizar un ratón transgénico con un antígeno de IL-17A, expresando dicho ratón un constructo de ácido nucleico que comprende genes V de cadena pesada humanos y no siendo capaz de elaborar cadenas ligeras o pesadas endógenas funcionales,

b) generar una biblioteca de secuencias que comprenden secuencias de dominio V_H de dicho ratón y

c) aislar las secuencias que comprenden secuencias de dominio V_H de dichas bibliotecas.

En el presente documento se describe una molécula de unión que comprende un dominio V_H obtenido o que puede obtenerse de un ratón que no es capaz de elaborar cadenas ligeras o pesadas endógenas funcionales, por ejemplo, a través del método descrito anteriormente.

En un ejemplo, el roedor es un ratón. El ratón puede comprender un locus de cadena ligera lambda no funcional. Por tanto, el ratón no elabora una cadena ligera lambda endógena funcional. En un ejemplo, el locus de cadena ligera lambda está delecionado en parte o completamente o convertido en no funcional a través de inserción, inversión, un evento de recombinación, edición génica o silenciamiento génico. Por ejemplo, al menos los genes de región constante C1, C2 y C3 pueden convertirse en no funcionales. En un ejemplo, el locus está silenciado funcionalmente de modo que el ratón no elabore una cadena ligera lambda endógena funcional.

Además, el ratón puede comprender un locus de cadena ligera kappa no funcional. Por tanto, el ratón no elabora una cadena ligera kappa endógena funcional. En un ejemplo, el locus de cadena ligera kappa está delecionado en parte o completamente o convertido en no funcional a través de inserción, inversión, un evento de recombinación, edición génica o silenciamiento génico. En un ejemplo, el locus está silenciado funcionalmente de modo que el ratón no elabora una cadena ligera kappa endógena funcional.

El ratón que tiene loci de cadena L lambda y kappa endógenos silenciados funcionalmente puede, por ejemplo, elaborarse tal como se da a conocer en el documento WO 2003/000737.

Además, el ratón puede comprender un locus de cadena pesada no funcional. Por tanto, el ratón no elabora una cadena pesada endógena funcional. En un ejemplo, el locus de cadena pesada está delecionado en parte o completamente o convertido en no funcional a través de inserción, inversión, un evento de recombinación, edición génica o silenciamiento génico.

Por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 2004/076618, los 8 genes de inmunoglobulina de región constante de cadena pesada endógenos (μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, ϵ y α) están ausentes en el ratón, o parcialmente ausentes en la medida en la que son no funcionales, o los genes δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ y ϵ están ausentes y los genes flanqueantes μ y α están parcialmente ausentes en la medida de que se convierten en no funcionales, o los genes μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ y ϵ están ausentes y α está parcialmente ausente en la medida en que se convierte en no funcional, o δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, ϵ y α están ausentes y μ está parcialmente ausente en la medida de que se convierte en no funcional.

En un ejemplo, el locus está silenciado funcionalmente de modo que el ratón no elabora una cadena pesada/ligera endógena funcional.

Con deleción en parte quiere decirse que la secuencia génica de locus endógena se ha delecionado o alterado, por ejemplo, mediante una inserción, en la medida de que no se codifica ningún producto génico endógeno funcional mediante el locus, es decir que no se expresa ningún producto funcional desde el locus. Por ejemplo, el locus está silenciado funcionalmente.

En un ejemplo, el ratón comprende un locus de cadena pesada endógeno no funcional, un locus de cadena ligera lambda endógeno no funcional y un locus endógeno no funcional de cadena ligera kappa. Por tanto, el ratón no produce ninguna cadena ligera o pesada endógena funcional. Por tanto, el ratón es un ratón triple desactivado (TKO).

El ratón transgénico comprende un vector, por ejemplo, un cromosoma artificial de levadura (YAC) para expresar un locus de cadena pesada heterólogo. Los YAC son vectores que pueden emplearse para la clonación de insertos de ADN muy grandes en levadura. Además de comprender los tres elementos estructurales que actúan en cis esenciales para comportarse como cromosomas de levadura naturales (una secuencia de replicación autónoma (ARS), un centrómero (CEN) y dos telómeros (TEL)), su capacidad de aceptar insertos de ADN grandes les posibilita alcanzar el tamaño mínimo (150 kb) requerido para una estabilidad similar a cromosoma y para la fidelidad de transmisión en células de levadura. La construcción y el uso de YAC se conocen ampliamente en la técnica (por ejemplo, Bruschi, C.V. y Gjuracic, K. Yeast Artificial Chromosomes, Encyclopaedia of Life Sciences 2002 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group / www.els.net).

Por ejemplo, el YAC puede comprender una plétora de genes V_H , D y J humanos en combinación con genes de región constante de inmunoglobulina de ratón que carecen de dominios C_H1 , regiones potenciadoras y reguladoras de ratón. Un ejemplo de un YAC de este tipo se proporciona en la sección de ejemplos.

Pueden usarse métodos alternativos conocidos en la técnica para la deleción o inactivación de genes de inmunoglobulina de ratón o rata endógenos y la introducción de genes V_H , D y J humanos en combinación con genes de región constante de inmunoglobulina de ratón que carecen de dominios C_H1 , regiones potenciadoras y reguladoras de ratón.

Pueden crearse ratones transgénicos según técnicas estándar tal como se ilustra en los ejemplos. Las dos rutas más caracterizadas para crear ratones transgénicos son por medio de microinyección pronuclear de material genético en oocitos recién fertilizados o por medio de la introducción de células madre embrionarias transfectadas de manera estable en embriones en fase de mórula o blastocisto. Independientemente de cómo se introduzca el material genético,

los embriones manipulados se transfieren a receptores hembra pseudoembarazadas, en las que continúa el embarazo y nacen crías transgénicas candidatas.

5 Las principales diferencias entre estos métodos amplios son que los clones ES pueden examinarse extensamente antes de su uso para crear un animal transgénico. Por el contrario, la microinyección pronuclear se basa en que el material genético se integra en el genoma huésped tras su introducción y, hablando en general, la incorporación exitosa del transgén no puede confirmarse hasta después de que hayan nacido las crías.

10 Hay muchos métodos conocidos en la técnica para tanto ayudar con como determinar si se produce una integración exitosa de transgenes. Los animales transgénicos pueden generarse mediante múltiples medios que incluyen integración al azar del constructo en el genoma, integración específica del sitio o recombinación homóloga. Hay diversas herramientas y técnicas que pueden usarse para tanto impulsar como seleccionar la integración de transgenes y la modificación posterior que incluyen el uso de marcadores de resistencia a fármacos (selección positiva), recombinasas, intercambio de casetes mediada por recombinación, técnicas de selección negativa y nucleasas para mejorar la eficiencia de recombinación. La mayoría de estos métodos se usan comúnmente en la modificación de células ES. Sin embargo, algunas de las técnicas pueden tener utilidad para potenciar la transgénesis mediada por medio de inyección pronuclear.

20 Pueden usarse refinamientos adicionales para dar una generación más eficiente de la línea transgénica dentro del fondo deseado. Tal como se ha descrito anteriormente, en ejemplos preferidos, la expresión de inmunoglobulina de ratón endógena se silencia para permitir el uso único del transgén introducido para la expresión del repertorio solo de cadena pesada que puede explotarse para el descubrimiento de fármacos. Pueden usarse ratones manipulados genéticamente, por ejemplo, ratones TKO que están silenciados para todos los loci de inmunoglobulina endógenos (cadena pesada de ratón, cadena kappa de ratón y cadena lambda de ratón) tal como se ha descrito anteriormente. La transferencia de cualquier transgén introducido a este fondo TKO puede conseguirse por medio de cría (ya sea convencional o con la inclusión de una etapa de IVF para dar un escalado eficiente del proceso). Sin embargo, también es posible incluir el fondo de TKO durante el procedimiento de transgénesis. Por ejemplo, para microinyección, los oocitos pueden derivarse de donantes TKO. De manera similar, células ES de embriones TKO pueden derivarse para su uso en la transgénesis.

30 La molécula de unión puede conjugarse con otro resto. Este puede seleccionarse de una toxina, una enzima, un radioisótopo, otra etiqueta detectable, péptido, proteína y resto químico de interés.

35 Por ejemplo, la molécula de unión pueden etiquetarse con una etiqueta detectable o funcional. Una etiqueta puede ser cualquier molécula que produce o puede inducirse para producir una señal, incluyen, pero sin limitarse a, agentes fluorescentes, radioetiquetas, enzimas, agentes quimioluminiscentes o fotosensibilizadores. Por tanto, la unión puede detectarse y/o medirse detectando fluorescencia o luminiscencia, radioactividad, actividad enzimática o absorbancia de luz.

40 La semivida de la molécula de unión puede aumentarse mediante una modificación química, especialmente mediante PEGilación o unión a una albúmina sérica, por ejemplo, HAS, o una molécula de unión anti-HAS, o mediante incorporación en un liposoma.

45 La molécula de unión puede estar modificada covalentemente. El término "modificada covalentemente/modificación covalente" incluye modificaciones de un anticuerpo y una molécula de unión, por ejemplo, de una secuencia especificada; con un agente derivatizante proteínico o no proteínico orgánico, fusiones a secuencias de polipéptido heterólogas y modificaciones postraduccionales. Los polipéptidos modificados covalentes, por ejemplo, de una secuencia especificada, todavía tienen las propiedades funcionales descritas en el presente documento, por ejemplo, la capacidad de unirse a la IL-17 humana o, por ejemplo, neutralizar la producción de IL-6 de fibroblastos dérmicos humanos inducidos por IL-17 mediante reticulación. Las modificaciones covalentes se introducen generalmente haciendo reaccionar residuos de aminoácido seleccionados como diana con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con lados o residuos terminales seleccionados, o empleando mecanismos de modificaciones postraduccionales que funcionan en células huésped recombinantes seleccionadas. Ciertas modificaciones postraduccionales son el resultado de la acción de células huésped recombinantes sobre el polipéptido expresado. Los residuos de glutamilo y asparaginilo se desamidán con frecuencia postraduccionally para dar los residuos de glutamilo y aspártico correspondientes. Alternativamente, estos residuos se desaminan en condiciones suavemente ácidas. Otras modificaciones postraduccionales incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo, tirosina o treonilo, metilación de los grupos [alfa]-amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina. Las modificaciones covalentes, por ejemplo, incluyen proteínas de fusión que comprenden una molécula de unión, por ejemplo, de una secuencia especificada y sus variantes de secuencia de aminoácidos, tales como inmunoadhesinas, y fusiones N-terminales a secuencias señal heterólogas.

65 En el presente documento se describe una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión a IL-17A y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable. La molécula de unión o las composiciones pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente y ejemplos de la forma de administración de la molécula de unión o la composición incluyen, sin limitación, tópica, en particular dérmica, parenteral e intranasal. La administración

parenteral incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intraesternal o técnicas de infusión. Las composiciones pueden tomar la forma de una o más unidades de dosificación.

La composición puede estar en forma de un líquido, por ejemplo, una disolución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser útil para la administración mediante inyección. Las composiciones líquidas, ya sean disoluciones, suspensiones u otra forma similar, puede incluir también uno o más de los siguientes: diluyentes estériles tales como agua, solución salina, preferiblemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites fijos tales como mono- o diglicéridos sintéticos, polietilenglicoles, glicerina u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabeno; y agentes para el ajuste de la tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa. Una composición puede estar encerrada en una ampolla, una jeringa desechable o un vial multidosis hecho de vidrio, plástico u otro material.

En ejemplos específicos, puede ser deseable administrar una o más moléculas de unión o composiciones localmente al área que necesita tratamiento.

Por tanto, en una realización preferida de todos los aspectos, la administración de la composición o molécula de unión de la invención es mediante administración tópica a piel sana o enferma. La molécula de unión es capaz de penetrar al menos en la capa externa de la piel y por tanto puede administrarse por vía dérmica o transdérmica. Por consiguiente, en una realización de los diversos aspectos, la administración tópica de la composición o molécula de unión a la piel es administración directa a la piel para exposición no sistémica local. Por ejemplo, la administración tópica de la la composición o molécula de unión a la piel es administración directa a la piel para proporcionar exposición sistémica tras la penetración a través de todas las capas de la piel.

La piel que se trata puede ser piel enferma o sana. En una realización preferida, la enfermedad de la piel es psoriasis o dermatitis atópica.

Preferiblemente, el área superficial al que se aplica es el 1%-30% del área de superficie corporal, por ejemplo, el 1%-10% o el 1-20%. Por tanto, la administración puede ser al 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 27%, 26%, 28%, 29% o 30% del área de superficie corporal. En una realización, el estado patológico es leve. Por ejemplo, el estado patológico es moderado. Por ejemplo, el estado patológico es grave. Para el tratamiento de la psoriasis, la administración es a áreas afectadas, normalmente una o más áreas seleccionadas de codos, rodillas, palmas de las manos, cuero cabelludo, plantas de los pies, genitales, muslos superiores, ingle, nalgas, cara y torso. Para el tratamiento de la dermatitis atópica, la administración es a áreas afectadas, normalmente una o más áreas seleccionadas de cara, antebrazos y muñecas.

La molécula de unión puede aplicarse directamente a piel enferma o sana en forma de crema, loción, pulverizaciones, disolución, gel, pomada, pasta, emplaste, parche, bioadhesivo, suspensión o similar, y/o puede prepararse para contener liposomas, micelas y/o microesferas. En una realización, la molécula de unión se aplica directamente a piel enferma en forma de un líquido (por ejemplo, una pulverización), emplasto, parche o bioadhesivo. En una realización, la molécula de unión se aplica directamente a piel enferma en forma de una microemulsión.

Las microemulsiones se definen generalmente como que tienen un diámetro de gotita dentro del intervalo de 2-500 nm, permitiendo así una administración efectiva de principios activos a la piel. Las microemulsiones se han propuesto para su uso en la potenciación de la administración transdérmica de una gama de compuestos. Esto se describe en el documento US2007/0243132.

Específicamente, tal como se usa en el presente documento, el término microemulsión se refiere a una formulación que comprende una fase oleosa, una fase acuosa y un tensioactivo, siendo la microemulsión capaz de la administración transdérmica de una molécula de unión, por ejemplo, que comprende un dominio V_H humano tal como se describe en el presente documento. Preferiblemente, la microemulsión tiene un diámetro de gotita dentro del intervalo de 2 - 500nm. En un ejemplo, la microemulsión comprende además un cotensioactivo, un codisolvente o una combinación de los mismos.

Las microemulsiones pueden ser microemulsión de aceite en agua, siendo el tensioactivo preferentemente soluble en agua; microemulsión de agua en aceite, estando el tensioactivo principalmente en la fase oleosa; una microemulsión trifásica, coexistiendo una fase media rica en tensioactivo con las fases acuosa y oleosa; una monofase bicontinua; una disolución micelar de fase única que se forma tras la adición de una cantidad suficiente de anfífilo (tensioactivo más alcohol); o una disolución micelar hinchada.

Las microemulsiones pueden producirse mediante métodos conocidos en la técnica. En general, las microemulsiones se producen emulsionando componentes en condiciones que incluyen normalmente una fuerza suficiente o la temperatura requerida para generar el nivel de dispersión, la conductividad, la viscosidad, la capacidad de percolación u otras características de dispersión requeridas.

La formación de microemulsiones puede evaluarse usando técnicas de dispersión y espectroscópicas tales como dispersión de neutrones, dispersión promedio en el tiempo, dispersión de luz cuasieléctrica, es decir, espectroscopía

ultrasónica de alta resolución o espectroscopía de correlación de fotones. Los coeficientes de división de las microemulsiones pueden medirse también cromatográficamente. La selección de formulaciones particulares se basa en varios paradigmas diferentes dependiendo de la aplicación deseada. Los paradigmas ilustrativos incluyen el equilibrio hidrófilo-lipófilo, la temperatura de inversión de fase o la relación de energía cohesiva. Las microemulsiones pueden formularse usando una amplia gama de líquidos inmiscibles y otros agentes adicionales.

The microemulsión puede comprender una fase oleosa en el intervalo de desde el 50 hasta el 99% en peso, lo más preferiblemente desde el 50 hasta el 90% en peso; una fase acuosa en el intervalo de desde el 2 hasta el 50% en peso, lo más preferiblemente desde el 1 hasta el 50 en peso; desde el 0,1 hasta el 90% en peso de tensioactivo, preferiblemente desde el 1 hasta el 90% en peso de tensioactivo. La microemulsión puede comprender además del 0,1 al 90% en peso de cotensioactivo o codisolvente; preferiblemente del 1 al 90% en peso de cotensioactivo o codisolvente.

La fase oleosa puede comprender aceites naturales derivados de plantas o animales, tales como aceites vegetales, aceites de girasol, aceites de coco, aceites de almendra; di- o triglicéridos naturales o sintéticos purificados (tales como Crodamol GTCC® y Capmul MCM®); fosfolípidos y sus derivados (tales como lecitina o lisolecitina); ésteres de ácido graso (tales como miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, oleato de etilo, éster etílico de ácido oleico); hidrocarburos (tales como hexano, la serie de n-decano a n-octadecano); y/o grasas y aceites glicerolados (tales como monooleato de glicerilo, monocaprilato de glicerilo, monocaprato de glicerol, monocaprilato de propilenglicol, monolaurato de propilenglicol).

Otros componentes de fase oleosa incluyen, pero no se limitan a, Labrafil M 1944 CS®, benceno, tetrahidrofurano y n-metilpirrolidona, o hidrocarburos halogenados, tal como cloruro de metileno, o cloroformo. En un ejemplo particular, la fase oleosa comprende Crodamol GTCC® y Capmul MCM®, a una relación de 3:1. El componente de aceite se usa o bien solo o bien en combinación con otro componente o componentes de aceite. Cada aceite o mezcla única de aceites puede requerir un diferente tensioactivo o mezcla de tensioactivos o tensioactivos y cotensioactivos para formar una microemulsión con la fase acuosa, tal como puede determinarse de manera rutinaria por los expertos en la técnica. Los componentes de fase acuosa pueden comprender agua y cualquier componente soluble en agua en agua, incluyendo uno o más agentes farmacéuticos.

La microemulsión puede comprender además disolventes u otros agentes para potenciar la formación o estabilidad de la emulsión. Pueden introducirse otros agentes para proporcionar funciones tales como pH, contenido iónico, polimerización, sabor, fragancia, esterilidad, color, viscosidad, etc.

Las microemulsiones pueden generarse también usando cualquier material coloidal polimérico, monomérico o híbrido o de plástico sintético adecuado.

Según los métodos y los usos expuestos anteriormente, la molécula de unión puede administrarse junto con uno o más potenciadores de la penetración en la piel químicos. Ejemplos de potenciadores de la penetración en la piel se exponen más adelante.

Por ejemplo, la molécula de unión se administra usando oclusión. En un ejemplo, la molécula de unión se administra a piel sana o enferma junto con un potenciador de la penetración en la piel químico y usando oclusión. En un ejemplo, la molécula de unión se administra a piel sana o enferma como microemulsión y usando oclusión.

Por ejemplo, la administración puede mejorarse usando potenciadores de la penetración en la piel no químicos, por ejemplo, fonoforesis, sonoforesis, electroporación o usando la técnica de microagujas. Esta usa agujas pequeñas (10-200 µm de altura y 10-50 µm de anchura) que están conectadas con el reservorio de fármaco. El disposición de administración por microagujas se aplica a la superficie de la piel sin alcanzar las terminaciones nerviosas de la dermis superior.

Una molécula de unión administrada tal como se ha expuesto anteriormente es capaz de penetrar al menos en la capa externa de la piel y por tanto administra una cantidad terapéutica efectiva de la molécula de unión para tratar la enfermedad. Una molécula de unión administrada tal como se expone en el presente documento es capaz de penetrar en la piel en preferiblemente 6 horas o menos, por ejemplo, 1 hora o menos.

En el presente documento se describe una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión y un potenciador de la penetración en la piel que facilita o mejora la penetración en la piel. A menos que se especifique lo contrario, el término potenciador de la penetración en la piel tal como se usa en el presente documento se refiere a un potenciador de la penetración en la piel químico. Numerosos potenciadores de la penetración químicos se conocen en la técnica y pueden usarse en la composición. Estos incluyen, pero no se limitan a: agua, alcoholes, preferiblemente alcoholes con hasta seis átomos de carbono, por ejemplo, etanol, glicoles, por ejemplo, dietilenglicol alcohólico (Transcutol®), aminoacetatos alquil-N,N-disustituidos, por ejemplo, dodecil-N,N-dimetil-aminoacetato, ésteres, por ejemplo, acetato de etilo, Azone® y derivados, tensioactivos, por ejemplo, dodecilsulfato sódico, terpenos y terpenoides, por ejemplo, d-limoneno, ácidos grasos, por ejemplo, ácido oleico, urea y derivados, por ejemplo, 1,3-difenil-urea, pirrolidonas, por ejemplo, N-metil-2-pirrolidona, y ácido 2-pirrolidona-5-carboxílico, ciclodextrinas, por

ejemplo, betaciclodextrina, sulfóxidos, por ejemplo, dimetilsulfóxido. El experto en la técnica conoce otros potenciadores de la penetración en la piel. En un ejemplo, el potenciador no es agua. En un ejemplo, los potenciadores de la penetración en la piel se seleccionan de uno o más de propilenglicol, miristato de isopropilo y Azone. Potenciadores de la penetración preferidos son DMSO, azone, Transcutol®, miristato de isopropilo, ácido oleico o combinaciones de los mismos, por ejemplo, tal como se exponen en las tablas 13 y 14 y en los ejemplos.

En un ejemplo, el potenciador de la penetración no es uno o más de agua, etanol, derivados de polietilenglicol, derivados de polioxietileno tal como polisorbato, un alcohol graso tales como alcohol cetílico, alcohol estearílico, o alcohol ceroestearílico, glicerol y propilenglicol.

La cantidad de la molécula de unión que es efectiva/activa en el tratamiento de un trastorno o estado particular dependerá de la naturaleza del trastorno o estado, y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Además, opcionalmente pueden emplearse ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa que debe emplearse en las composiciones dependerá también de la vía de administración, y la gravedad de la enfermedad o del trastorno, y debe decidirse según el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente.

Las composiciones comprenden una cantidad efectiva de una molécula de unión de modo que se obtenga una dosificación adecuada. La dosificación correcta de los compuestos variará según la formulación particular, el modo de aplicación y su sitio particular, el huésped y la enfermedad que esté tratándose. Otros factores como la edad, el peso corporal, el sexo, la dieta, el momento de administración, la tasa de excreción, el estado del huésped, las combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción y la gravedad de la enfermedad deberán tenerse en cuenta. La administración puede llevarse a cabo de manera continua o periódica dentro de la dosis tolerada máxima.

Normalmente, esta cantidad es de al menos aproximadamente el 0,01% de una molécula de unión en peso de la composición.

Las composiciones preferidas se preparan de modo que una unidad de dosificación parenteral contenga desde aproximadamente el 0,01% hasta aproximadamente el 2% en peso.

Para la administración intravenosa, la composición puede comprender desde aproximadamente de manera normal aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 250 mg/kg del peso corporal del animal, preferiblemente, entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg del peso corporal del animal, y más preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg del peso corporal del animal.

Las presentes composiciones pueden tomar la forma de portadores adecuados, tales como aerosoles, pulverizaciones, suspensiones o cualquier otra forma adecuada para su uso. Otros ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin.

También pueden usarse liposomas y micelas.

Los liposomas son vesículas microscópicas que tienen una pared lipídica que comprende una bicapa lipídica y, en el presente contexto, encapsulan anticuerpo solo de cadena pesada o composición. Las preparaciones liposomales en el presente documento incluyen preparaciones catiónicas (cargas positivamente), aniónicas (cargas negativamente) y neutras. Los liposomas catiónicos están fácilmente disponibles. Por ejemplo, liposomas de N[1-2,3-dioleiloxy]propil]-N,N,N-trietil-amonio (DOTMA) están disponibles bajo el nombre comercial Lipofectin (GIBCO BRL, Grand Island, NY). De manera similar, los liposomas aniónicos y neutros están también fácilmente disponibles o pueden prepararse fácilmente usando materiales fácilmente disponibles. Tales materiales incluyen fosfatidilcolina, colesterol, fosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG) y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales pueden mezclarse también con DOTMA en relaciones apropiadas. Métodos para elaborar liposomas usando estos materiales se conocen ampliamente en la técnica.

Se conoce en la técnica que las micelas están compuestas de moléculas de tensioactivo dispuestas para que sus grupos de cabeza polares formen una envuelta esférica externa, mientras que las cadenas hidrocarbonadas, hidrófobas, están orientadas hacia el centro de la esfera, formando un núcleo. Las micelas se forman en una disolución acuosa que contiene tensioactivo a una concentración suficientemente alta de modo que resulten de manera natural micelas. Los tensioactivos útiles para formar micelas incluyen, pero no se limitan a, laurato de potasio, octanosulfonato de sodio, decanosulfonato de sodio, dodecanosulfonato de sodio, laurilsulfato de sodio, docusato de sodio, bromuro de deciltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de tetradeciltrimetilamonio, cloruro de tetradeciltrimetilamonio, cloruro de dodecilamonio, polioxil-8-dodecil éter, polioxil-12-dodecil éter, nonoxinol 10 y nonoxinol 30.

De manera similar, pueden incorporarse microesferas a las presentes formulaciones. Como los liposomas y las micelas, las microesferas encapsulan esencialmente uno o más componentes de las presentes formulaciones. Están formadas generalmente, aunque no necesariamente, a partir de lípidos, preferiblemente lípidos cargados tales como

fosfolípidos. La preparación de microesferas lipídicas se conoce ampliamente en la técnica y se describe en los textos y la bibliografía pertinentes.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse usando metodología ampliamente conocida en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición prevista para administrarse mediante inyección puede prepararse combinando una molécula de unión con agua para formar una disolución. Puede añadirse un tensioactivo para facilitar la formación de una disolución o suspensión homogénea.

La divulgación se refiere además a un método para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad que comprende administrar una molécula de unión a un paciente, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de una molécula de unión y/o de una composición farmacéutica. Más en particular, en el presente documento se describe un método para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo no limitativo que consiste en las enfermedades y los trastornos listados en el presente documento, comprendiendo dicho método administrar, a un sujeto que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente activa de una molécula de unión o una composición farmacéutica. Ejemplos de las enfermedades relacionadas con el sistema inmune que pueden tratarse estarán claros para el experto en la técnica basándose en la divulgación en el presente documento, e incluyen, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, estados inflamatorios, alergias y estados alérgicos, reacciones de hipersensibilidad, infecciones graves, y rechazo de trasplante de órganos o tejidos.

La divulgación se refiere también a una molécula de unión para su uso en el tratamiento de una enfermedad. La divulgación se refiere también a una molécula de unión para su uso en el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, enfermedad autoinmunitaria, estados inflamatorios, alergias y estados alérgicos, reacciones de hipersensibilidad, infecciones graves, y rechazo de trasplante de órganos o tejidos.

La divulgación se refiere al uso de una molécula de unión en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, enfermedad autoinmunitaria, estados inflamatorios, alergias y estados alérgicos, reacciones de hipersensibilidad, infecciones graves, y rechazo de trasplante de órganos o tejidos. Según los diferentes aspectos anteriores, la enfermedad puede seleccionarse de la siguiente lista no limitativa: psoriasis, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica, miopatías inflamatorias idiopáticas, síndrome de Sjogren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, tiroiditis, diabetes mellitus, enfermedad renal mediada de manera inmune, enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain Barre, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis activa crónica autoinmune, infecciosa, , cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa y colangitis esclerosante, enfermedad inflamatoria del intestino, enteropatía sensible al gluten, y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel mediadas de manera autoinmune o inmune incluyendo enfermedades de la piel bullosas, eritema multiforme y dermatitis por contacto, enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a los alimentos y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón tal como neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, trastornos hematológicos autoinmunes (incluyendo, por ejemplo, anemia hemolítica, anemia aplásica, anemia de glóbulos rojos pura y trombocitopenia idiopática), enfermedad inflamatoria del intestino autoinmune (incluyendo, por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y síndrome del intestino irritable), enfermedades asociadas a un trasplante incluyendo rechazo de injerto y enfermedad de injerto frente a huésped.

Las moléculas de unión son también útiles para el tratamiento, la prevención o la mejora de asma, bronquitis, neuromoconiosis, enfisema pulmonar, y otras enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias.

En un ejemplo preferido, la enfermedad se selecciona de psoriasis, espondiloartropatías, uveítis, dermatitis atópica y asma.

Los anticuerpos son útiles para tratar reacciones inflamatorias agudas e hiperagudas no deseables que están mediadas por IL-17, o implican la producción de IL-17, o la promoción de la liberación de TNF por parte de IL-17, por ejemplo, infecciones agudas, por ejemplo, choque séptico (por ejemplo, choque endotóxico y síndrome de dificultad respiratoria del adulto), meningitis, neumonía; y quemaduras graves; y para el tratamiento de caquexia o síndrome de emaciación asociados con liberación de TNF mórbida, posterior a infección, cáncer o disfunción orgánica, especialmente caquexia relacionada con SIDA, por ejemplo, asociada con o como consecuencia de infección por VIH.

Las moléculas de unión son particularmente útiles para tratar enfermedades del metabolismo de los huesos incluyendo osteoartritis, osteoporosis y otras artritis inflamatorias, y pérdida ósea en general, incluyendo pérdida ósea relacionada con la edad, y en particular enfermedad periodontal.

La molécula de unión puede administrarse como el único principio activo o en combinación con uno o más de otros fármacos, por ejemplo, un agente inmunosupresor o inmunomodulador u otro agente antiinflamatorio, por ejemplo, para el tratamiento o la prevención de las enfermedades mencionadas anteriormente. Por ejemplo, la molécula de unión puede usarse en combinación con anticuerpos monoclonales inmunosupresores, por ejemplo, anticuerpos

monoclonales para receptores de leucocitos, por ejemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD40, CD45, CD58, CD80, CD86 o sus ligandos; otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo, una molécula de unión recombinante que tiene al menos una porción del dominio extracelular de CTLA4 o un mutante de la misma, por ejemplo, al menos una porción extracelular de CTLA4 o un mutante de la misma unida a una secuencia de proteína distinta de CTLA4, por ejemplo, CTLA4Ig (por ejemplo, denominada ATCC 68629) o una mutante de la misma, por ejemplo, LEA29Y; inhibidores de moléculas de adhesión, por ejemplo, antagonistas de LFA-I, antagonistas de ICAM-I 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 para TNF, por ejemplo, infliximab, adalimumab, CDP870, o constructos de receptores para TNF-RI o TNF-RII, por ejemplo, Etanercept®, PEG-TNF-RI; bloqueadores de citocinas proinflamatorias, bloqueadores de IL-I, por ejemplo, Anakinra o trampa de IL-I, AAL160, ACZ 885, bloqueadores de IL-6; bloqueadores de quimiocinas, por ejemplo, inhibidores o activadores de proteasas, por ejemplo, metaloproteasas, anticuerpos anti-IL-15, anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos anti-CD20, AINE, tal como aspirina, o un agente antiinfeccioso. Esta lista no está limitada a los agentes mencionados.

La molécula de unión puede administrarse al mismo tiempo o en un momento diferente que el otro fármaco, por ejemplo, simultáneamente, por separado o secuencialmente.

La divulgación se refiere también a métodos para diagnosticar una enfermedad. Enfermedades a modo de ejemplo se listan anteriormente. En una realización, la enfermedad es psoriasis. El método comprende determinar el nivel de la expresión de IL-17A detectando la unión de una molécula de unión descrita en el presente documento en una muestra y comparando el nivel de expresión de IL-17A en la muestra de prueba con el nivel de expresión en una muestra control de un sujeto no psoriásico o con un valor estándar o intervalo de valores estándar para un sujeto no psoriásico. Una elevación en la expresión de IL-17A en la muestra de prueba en relación con el control o el estándar indica la presencia de la enfermedad.

En otro aspecto, la divulgación describe un kit que contiene una molécula de unión útil para el tratamiento de una enfermedad descrita anteriormente y opcionalmente instrucciones de uso.

La divulgación se refiere también a métodos de detección usando la molécula de unión. Dada su capacidad para unirse a IL-17A humana, las moléculas de unión a IL-17A humana, dadas a conocer en el presente documento pueden usarse para detectar IL-17A (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma), usando un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica tisular. Se proporciona un método para detectar IL-17A en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con una molécula de unión, dada a conocer en el presente documento, y detectar si la molécula de unión se unió a IL-17A o molécula de unión no unida, para detectar de ese modo IL-17A en la muestra biológica. La molécula de unión se etiqueta directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos.

Alternativamente a etiquetar la proteína de unión, la IL-17A humana puede evaluarse en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competición utilizando patrones de IL-17 etiquetados con una sustancia detectable y una molécula de unión a IL-17 humana no etiquetada. En este ensayo, la muestra biológica, los patrones de IL-17 etiquetados y la molécula de unión a IL-17A humana se combinan y se determina la cantidad de patrón de IL-17 etiquetado unido a la molécula de unión no etiquetada. La cantidad de IL-17A humana en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de IL-17 etiquetado unido a la molécula de unión a IL-17. De manera similar, la IL-17 humana también puede someterse a ensayo en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competición utilizando patrones de IL-17 etiquetados con una sustancia detectable y una molécula de unión a IL-17 humana no etiquetada.

Tal como se explica en el presente documento, las moléculas de unión son capaces de neutralizar la actividad de IL-17, por ejemplo, actividad de IL-17 humana, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por consiguiente, tal molécula de unión dada a conocer en el presente documento puede usarse para inhibir la actividad de IL-17, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene IL-17, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen IL-17 con la que una molécula de unión dada a conocer en el presente documento reacciona de manera cruzada. En una realización, se proporciona un método para inhibir o aumentar la actividad de IL-17 que comprende poner en contacto IL-17 con una molécula de unión dada a conocer en el presente documento, de modo que se inhiba o aumente la actividad de IL-17. Por ejemplo, en un cultivo celular que contiene, o del que se sospecha que contiene, IL-17, puede añadirse una molécula de unión dada a conocer en el presente documento al medio de cultivo para inhibir la actividad de IL-17 en el cultivo.

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente divulgación tendrán los significados que se entienden comúnmente por los expertos habituales en la técnica. Aunque la divulgación anterior proporciona una descripción general del objeto abarcado dentro del alcance de la presente invención, incluyendo métodos, así como el mejor modo de los mismos, de elaboración y uso de esta

invención, los siguientes ejemplos se proporcionan para posibilitar adicionalmente a los expertos en la técnica poner en práctica esta invención y para proporcionar una descripción escrita completa de la misma.

"Y/o" cuando se use en el presente documento debe tomarse como una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" debe tomarse como la divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, igual que si cada uno se expusiese individualmente en el presente documento.

La invención se describe adicionalmente en los ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. Construcción de ratones Tg/TKO

Se crearon ratones que portan un locus transgénico de anticuerpo de cadena pesada en configuración de línea germinal dentro de un fondo que está silenciado para la expresión de anticuerpo de cadena pesada y ligera endógeno (triple desactivado, o TKO) tal como se describió previamente (documentos WO2004/076618 y WO2003/000737, Ren *et al.* Genomics, 84, 686, 2004; Zou *et al.*, J. Immunol., 170, 1354, 2003). Resumiendo, los ratones transgénicos se derivando tras la microinyección pronuclear de oocitos recién fertilizados con un cromosoma artificial de levadura (YAC) que comprende una plétora de genes V_H, D y J humanos en combinación con genes de región constante de inmunoglobulina de ratón que carecen de dominios C_H1, regiones potenciadoras y reguladoras de ratón. Los cromosomas artificiales de levadura (YAC) son vectores que pueden emplearse para la clonación de insertos de ADN muy grandes en levadura. Al igual que comprender los tres elementos estructurales que actúan en cis esenciales para comportarse como cromosomas de levadura naturales (una secuencia de replicación autónoma (ARS), un centrómero (CEN) y dos telómeros (TEL)), su capacidad de aceptar insertos de ADN grandes les posibilita alcanza el tamaño mínimo (150 kb) requerido para la estabilidad similar a cromosoma y para la fidelidad de transmisión en células de levadura. La construcción y el uso de YAC se conocen ampliamente en la técnica (por ejemplo, Bruschi, C.V. y Gjuracic, K. Yeast Artificial Chromosomes, *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES* 2002 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group / www.els.net).

El YAC usado era de aproximadamente 340 kb y comprende 10 genes V de cadena pesada humanos en su configuración natural, genes D y J de cadena pesada humanos, un gen Cy1 murino y un gen potenciador de 3' murino. Carece del exón C_H1. Específicamente, el YAC comprendía (de 5' a 3'): telómero-gen marcador *TRP1* de levadura-centrómero-10 genes V humanos-genes D humanos-genes J humanos-potenciador μ de ratón y conmutador-gen Cy1 (C_H1 Δ) de ratón-potenciador de 3' de ratón-gen de resistencia a higromicina-gen marcador de levadura *HIS3*-telómero.

Los ratones fundadores transgénicos se retrocruzaron con animales que carecían de expresión de inmunoglobulina endógena para crear las líneas Tg/TKO usadas en los estudios de inmunización descritos.

EJEMPLO 2. Antígeno para inmunización

Las inmunizaciones usaron proteína purificada recombinante. La IL-17A humana recombinante se adquirió de Peprotech (Peprotech, n.º de cat. AF-200-17).

EJEMPLO 3. Protocolo de inmunización

En el presente caso, se administró proteína recombinante a los Tg/TKO. Resumiendo, ratones con edades de 8 - 12 semanas de edad recibieron cada uno un total de 10 ug de proteína recombinante, emulsionada en adyuvante de Freund completo y se administraron por vía subcutánea, seguido de refuerzos de 1 - 10 ug de proteína recombinante, emulsionada en adyuvante de Freund incompleto, administrada también por vía subcutánea, facilitada a diversos intervalos tras el cebado inicial. Una dosis final de antígeno se administró por vía intraperitoneal, en solución salina tamponada con fosfato, en ausencia de adyuvante.

También pueden emplearse vías y procedimientos de inmunización alternativos. Por ejemplo, pueden usarse diferentes adyuvantes o procedimientos de potenciación inmunitaria en lugar de adyuvante de Freund. Las inmunizaciones de ADN se administran a menudo por vía intramuscular o por medio de una pistola génica.

Las células transfectadas o las preparaciones de membrana a partir de tales células se administran a menudo, aunque no exclusivamente, por vía intraperitoneal.

EJEMPLO 4. ELISA de suero

Durante y tras la inmunización, se recogió suero de ratones y se comprobó la presencia de respuestas de anticuerpo de cadena pesada al inmunógeno mediante ELISA. Se recubrieron placas Nunc Maxisorp (Nunc n.º de cat. 443404) durante la noche a 4°C con 50 μ l/pocillo de un antígeno recombinante de 5 μ g/ml de disolución PBS. Tras la decantación de la disolución de antígeno, se lavaron las placas usando PBS (preparada a partir de comprimidos de

PBS, Oxoid n.º de cat. BR0014G) suplementada con Tween® 20 al 0,05% (sigma P1379), seguido de lavados con PBS sin Tween® añadido. Para bloquear las interacciones de proteína no específicas, se añadió una disolución de leche desnatada en polvo al 3% (Marvel) en PBS a los pocillos y se incubó la placa durante al menos una hora a temperatura ambiente. Se prepararon diluciones de suero en leche desnatada en polvo al 3%/PBS en tubos o placas de polipropileno y se incubaron durante al menos una hora a temperatura ambiente antes de la transferencia a la placa de ELISA bloqueada en la que tuvo lugar una incubación adicional de al menos una hora. La proteína no unida se eliminó entonces mediante lavado usando lavados repetitivos con PBS/Tween® seguido de PBS. Una disolución de anticuerpo específico de Fcγ1 subclase 1, anti-IgG de ratón de cabra, conjugado con biotina (Jackson 115-065-205), preparada en PBS/3% μ se añadió entonces a cada pocillo y tuvo lugar una incubación adicional a temperatura ambiente durante al menos una hora. El anticuerpo de detección no unido se retiró mediante lavado repetido usando PBS/Tween® y PBS. Una disolución de neutravidina-HRP (Pierce 31030) en Marvel al 3%/PBS se añadió entonces a las placas de ELISA y se permitió que se uniera durante al menos 30 minutos. Tras un lavado adicional, se desarrolló el ELISA usando sustrato de TMB (Sigma n.º de cat. T0440) y se detuvo la reacción tras 10 minutos mediante la adición de disolución de H₂SO₄ 0,5 M (Sigma n.º de cat. 320501). Las absorbancias se determinaron mediante lectura a 450 nm. Ejemplos de datos de ELISA de suero se muestran en la Figura 7. También pueden usarse ensayos alternativos, tales como ensayos ELISPOT, para comprobar las respuestas de anticuerpo de cadena pesada inducidas por inmunización.

EJEMPLO 5. Generación de bibliotecas a partir de ratones inmunizados

a. Procesamiento de tejidos, extracción de ARN y fabricación de ADNc

El bazo, ganglios linfáticos inguinales y braquiales se recogieron para dar ARN posteriormente de cada animal inmunizado. Para cada animal, 1/3 del bazo y 4 ganglios linfáticos se procesaron por separado. Inicialmente, los tejidos se homogeneizaron; tras la transferencia de tejidos a tubos con perlas de matriz D de lisado (MP Bio n.º de cat. 116913100), se añadieron 600 μl de tampón RLT que contenía β-mercaptoetanol (kit Qiagen RNeasy® n.º de cat. 74104) antes de la homogeneización en un homogeneizador MP Bio Fastprep (n.º de cat. 116004500) usando ciclos de 40 segundos de 6 m/s. Los tubos que contenían los tejidos homogeneizados se transfirieron a hielo y se sedimentó el residuo mediante microcentrifugación a 10 g durante 5 minutos. Se retiraron 400 μl del sobrenadante y se usaron para RT-PCR.

Inicialmente, se extrajo ARN usando el kit Qiagen RNeasy® n.º de cat. 74104 siguiendo el protocolo del fabricante. Cada muestra de ARN se usó entonces para elaborar ADNc usando el kit de alta fidelidad de RT-PCR Superscript III (Invitrogen n.º de cat. 12574-035). Para cada muestra de ARN de bazo y de LN, se realizaron 5 reacciones de RT-PCR, cada una con cebador VH_J/F (largo) en combinación con un cebador para la familia VH1, VH2, VH3, VH4 o VH6. Detalles de los cebadores están a continuación;

Tabla 6 Cebadores

V1a/pelB (largo)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAG GTBCAGCTGGTGCACTCTGGGGCTGAGG SEQ ID No. 382
V2/pelB (largo)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAG ATCACCTTGAAGGAGTCTGG SEQ ID No. 383
V3/pelB (largo)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCSAG GTGCAGCTGGTGAGTCTGGGGGAGG SEQ ID No. 384
V4-4/pelB (largo)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAG GTGCAGCTGCAGGAGTCGGG SEQ ID No. 385
V6/pelB (largo)	GCCGCTGGATTGTTATTACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCCAG GTACAGCTGCAGCAGTCAGG SEQ ID No. 386
VH_J/F (largo)	CCGTGGTGATGGTGGTATGGCTACCGCCACCCTCGAGTGARGAG ACRGTGACC SEQ ID No. 387

Los residuos en **negrita** tienen homología con pUCG3

Se prepararon mezclas maestras para las reacciones de RT-PCR, basadas en los siguientes componentes de reacción en tubo.

12,5 μl mezcla de reacción 2x

0,5 µl cebador directo (10 uM)

0,5 µl cebador inverso (10 uM)

5 0,5µl mezcla de enzimas

500 ng - 1µg ARN

hasta 25 µl con agua

10 Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo en un termociclador usando las siguientes condiciones;

50°C 20 min

15 94°C 2 min

35 ciclos de	94°C 15 s
	58°C 30 s
	68°C 30 s

68°C 5 min

20 mantener a 4°C

Los productos en el intervalo de 370 pb se confirmaron mediante electroforesis en gel.

25 Para cada ratón, los productos de V_H amplificados para una familia dada del 1/3 de bazo y cada uno de los 4 ganglios linfáticos se agruparon entonces para su purificación usando el kit de purificación de PCR Thermo/Fermentas GeneJet (n.º de cat.K0702), que se usó según las instrucciones del fabricante, con los productos eluidos en 50 µl de agua.

b. Clonación en vector de fagémido

30 Se empleó el vector de fagémido, pUCG3, en estos estudios. Tal como se indica, V_H puede clonarse en pUCG3, usando métodos convencionales que implican digestiones con enzimas de restricción con NcoI y XhoI, ligado y transformación. Alternativamente, puede usarse un método basado en PCR para construir las bibliotecas de fagémidos de V_H. Ambos de estos procedimientos se usaron para generar bibliotecas a partir de las secuencias de V_H amplificadas. El primer método se usa ampliamente en la técnica. Para el método basado en PCR, se usó el siguiente procedimiento:

Se creó una versión linealizada de pUCG3 usando PCR; con los siguientes cebadores:

pUCG3-F3 CTCGAGGGTGGCGGTAGCCATCACCACCATC SEQ ID No. 388

40 pUCG3-R3 TCCATGGCCATCGCCGGCTGGGCGCGAG SEQ ID No. 389

Se uso la mezcla maestra de PCR de alta fidelidad Phusion con tampón GC (n.º de cat. F532L, NEB) para las reacciones de PCR que comprendía los siguientes reactivos;

mezcla Phusion GC 2x	25 µl
pUCG3	5-10 ng
Cebadores (10 uM)	1,25 µl de cada uno
DMSO	1,5 µl
H ₂ O libre de nucleasa	hasta un volumen final de 50 µl

Las condiciones de ciclización usadas fueron

98°C	30 segundos
------	-------------

50 10 ciclos de

98°C	10 segundos
58°C	20 segundos
68°C	2 minutos, 30 segundos

20 ciclos de

98°C	10 segundos
58°C	20 segundos
68°C	3 minutos
68°C	5 minutos
4°C	mantenimiento

- 5 El producto de PCR (3152 pb) se purificó en gel usando el kit de purificación en gel Fermentas GeneJet (n.º de cat. K0691), según las instrucciones del fabricante, con elución final en 40 µl de tampón de elución. Los productos de RT-PCR de V_H purificados se emplearon como megacebadores con el pUCG3 linealizado para dar productos de fagémido para la transformación y la creación de bibliotecas, basándose en las siguientes reacciones;

mezcla Phusion GC 2x	25 µl
pUCG3 linealizado	700 ng
Producto de PCR de V _H	250 ng
DMSO	1,5 µl
H ₂ O libre de nucleasa	hasta un volumen final de 50 µl

- 10 La PCR se realizó tal como sigue;

98°C 30 s	
98°C 10 s	} 10 ciclos
58°C 20 s	
72°C 2 min	
72°C 5 min	
mantenimiento a 10°C	

Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

- 15 Los diversos productos de V_H/fagémido de la familia se purificaron usando Ferment como kit de purificación de PCR (n.º de cat.K0702) según las instrucciones del fabricante siendo la elución final en 25 µl de H₂O y se usaron para transformaciones de TG1 *E. coli* (Lucigen, cat.: 60502-2) mediante electroporación usando cubetas de 10 x 1 mm BioRad® (BioRad® n.º de cat. 165-2089, un Eppendorf® Epurator y medio de recuperación precalentado (Lucigen, mezcla propietaria). Se añadieron 2 µl de los productos purificados a 25 µl de células para la electroporación, realizándose hasta 10 electroporaciones para cada producto de V_H/fagémido a 1800 v. Las células sometidas a electroporación se agruparon y se recuperaron en tubos Falcon de 50 ml incubados durante 1 hora a 37°C con agitación a 150 rpm. Se realizó una serie de diluciones de 10 veces de una alícuota de las transformaciones y se sembraron en placas petri que contenían 2xTY agar suplementado con glucosa al 2% (p/v) y 100 µg/ml de ampicilina. Las colonias resultantes sobre estas placas se usaron para estimar el tamaño de la biblioteca. El resto de la transformación se sembró en placas de bioensayo de gran formato que contenían 2xTY agar suplementado con glucosa al 2% (p/v) y 100 µg/ml de ampicilina. Todas las placas de agar se incubaron durante la noche a 30°C. Se añadieron 10 ml de caldo 2xTY a las placas de bioensayo de gran formato y se rasparon las colonias y se midió la DO600 (DO de 1,0 = 5 x 10⁸ células/ml). Las alícuotas se almacenaron a -80°C en crioviales tras la adición de disolución de glicerol al 50% v/v (50%) o se usaron directamente en un proceso de selección en fago.

30

En algunos casos, los clones se cogieron directamente y se determinó la secuencia para dar una estimación de la diversidad de la biblioteca. Normalmente, para cada ratón se construyó una biblioteca de presentación en fago con más de $1e8$ recombinantes para capturar completamente la diversidad de V_H en ese ratón.

5 EJEMPLO 6. Bibliotecas de V_H naif

Construcción de biblioteca de V_H1 humana *in vitro* naif

El armazón de V_H1 -02 humano se amplificó mediante PCR (Finnzymes F-531L) tal como sigue: 25 μ l de mezcla de PCR 2 xPhusion; 2,5 μ l de $V1a/B$ (10 μ M); 2,5 μ l de $VH3$ -93/F/C- (10 μ M); 10 ng de plásmido que codifica V_H 1-02 y dH_2O hasta un volumen final de 50 μ l. Las reacciones se calentaron entonces hasta 95°C durante 1 minuto seguido de 30 ciclos de PCR: 98°C 10 segundos, 54°C 30 segundos, 72°C 30 segundos. Los productos de PCR se analizaron entonces mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) seguido de tinción con bromuro de etidio. Los productos de amplificación por PCR se observaron al tamaño correcto de aproximadamente 300 pb (Fig. 6A).

ADNc humano de bazo, ganglio linfático, médula ósea y linfocitos de sangre periférica se adquirieron de fuentes comerciales (Invitrogen, Clontech). Se sintetizaron los cebadores oligonucleotídicos V_H CDR3/B/G- y VHJ/F para facilitar la amplificación por PCR de VH -CDR3 más secuencias de entramado 4 de V_H de ADNc de células B tal como sigue: 25 μ l de mezcla de PCR 2 xPhusion (Finnzymes F-531L); 2,5 μ l de $VHCDR3/B/G$ - (10 μ M); 2,5 μ l de $V_H J/F$ (10 μ M); 3 ng de ADNc y dH_2O hasta 50 μ l finales. Las reacciones se calentaron entonces hasta 95°C durante 1 minuto seguido de 30 ciclos de PCR: 98°C 10 segundos, 54°C 30 segundos, 72°C 30 segundos. Tras 30 ciclos, las reacciones de PCR se calentaron entonces a 72°C durante 8 minutos seguido de mantenimiento a 10°C. Los productos de PCR se analizaron entonces mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) seguido de tinción con bromuro de etidio. Los productos de amplificación por PCR se observaron al tamaño correcto de aproximadamente 50-100 pb (Fig. 6B).

Los productos de PCR de V_H -CDR3 humanos se ensamblaron entonces con el armazón V_H 1-02 para generar productos de ADN que codifican moléculas de unión de V_H de longitud completa. El armazón V_H 1-02 se ensambló con secuencias de V_H -CDR3 humanas amplificadas añadiendo lo siguiente: 12,5 μ l de mezcla de PCR 2x Phusion (Finnzymes F-531 L); 40 ng de producto de PCR V_H 1-02; 10 ng de cada producto de PCR V_H -CDR3 y dH_2O hasta 25 μ l finales. La reacción se calentó entonces hasta 95°C durante 1 minuto seguido de 8 ciclos de PCR: 98°C 10 segundos, 54°C 30 segundos, 72°C 30 segundos. Tras 8 ciclos, las reacciones de PCR se calentaron entonces a 72°C durante 8 minutos seguido de mantenimiento a 10°C. Entonces se amplificaron productos de V_H de longitud completa a partir de los productos de ensamblaje mediante PCR de arrastre: 100 μ l de mezcla de PCR 2x Phusion (Finnzymes F-531L); 10 μ l de oligonucleótido $V1a/B$ (10 μ M); 10 μ l de oligonucleótido VHJ/F (10 μ M); 10 μ l de productos de ensamblaje V_H 1-02 y dH_2O hasta un volumen final de 200 μ l. Las reacciones se calentaron entonces hasta 95°C durante 1 minuto seguido de 30 ciclos de PCR: 98°C 10 segundos, 54°C 30 segundos, 72°C 30 segundos. Tras 30 ciclos, las reacciones de PCR se calentaron entonces a 72°C durante 8 minutos seguido de mantenimiento a 10°C. Los productos de PCR se analizaron entonces mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) seguido de tinción con bromuro de etidio. Los productos de V_H de longitud completa se observaron al tamaño esperado de aproximadamente 400 pb (Fig. 6C). Los productos de PCR se purificaron usando columnas de purificación de PCR Fermentas (K0701) y se resuspendieron en dH_2O .

Para preparar bibliotecas para la presentación en fago, los productos de V_H de longitud completa se clonaron en el vector de fagémido pUCG3 mediante ligado y digestión por restricción. El ADN de pUCG3 y los productos de PCR de arrastre de V_H 1-02 se digirieron con enzimas de restricción NcoI (Fermentas FD0574) y XhoI (Fermentas FD0694) durante la noche a 37°C. Todos los productos de digestión se calentaron hasta 80°C durante 5 minutos y entonces se purificó cada producto usando columnas de purificación de PCR Fermentas (K0701) y finalmente se resuspendieron en dH_2O .

Los productos de V_H digeridos se ligaron con pUCG3 digerido de manera similar usando ADN ligasa NEB T4 (M0202M) siguiendo las instrucciones del fabricante. Resumiendo, el ADN de pUCG3 de digestión doble con NcoI/XhoI y los productos de V_H se mezclaron a una relación molar de 1:2 y se incubaron durante la noche con T4 ligasa a 16°C. Tras la incubación a 70°C durante 30 minutos, los productos de ligado se purificaron usando columnas de purificación de PCR Fermentas y finalmente se resuspendieron en dH_2O . Entonces, usando cubetas Biorad® (165-2089) y un micropulsador Biorad®, 2 μ l de los productos de ligado purificados se sometieron a electroporación en 25 μ l de células TG1 electrocompetentes (Lucigen 60502-1) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células TG1 sometidas a electroporación se sembraron en placas de 2xTY agar suplementadas con ampicilina a 100 μ g/ml y glucosa al 20% (p/v) y se incubaron durante la noche a 30°C. Además, una serie de dilución de células TG1 sometidas a electroporación se sembraron para determinar el tamaño de la biblioteca que se calculó que era de $7.7e9$ recombinantes.

Secuencias

Tabla 7 - Cebadores oligonucleotídicos (de 5' a 3')

V _H _J/F	GCTACCGCCACCCTCGAGTGARGAGACRGTGACC SEQ ID No. 390
V1a/B	GGAACAGACCACCATGGCCAGGTBCAGCTGGTGCAGTCTGGGG CTGAGG SEQ ID No. 391
VHCDR3/B/G-	GACACGGCCGTGTATTACTGTGC SEQ ID No. 392
VHCDR3/F/C-	GCACAGTAATACACGGCCGTGTC SEQ ID No. 393

Secuencias de armazón

secuencia de aminoácidos de V_H 1-02 SEQ ID No. 394

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPN
SGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYYCAR

secuencia de ácido nucleico de V_H 1-02 SEQ ID No. 395

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGT
GAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGG
GTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATCAACCCTAAC
AGTGGTGGCACAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGG
GACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGAC
ACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGA

EJEMPLO 7. Estrategias de selección para el aislamiento de V_H de unión a IL-17A

La preparación de reservas de fagos de biblioteca y de selecciones de presentación en fago se realizaron según métodos publicados (Antibody Engineering, editado por Benny Lo, capítulo 8, págs. 161-176, 2004). En la mayoría de los casos, se usó presentación en fago combinada con un enfoque de cribado para aislar los dominios V_H de unión. Sin embargo, pueden emplearse una variedad de diferentes métodos de selección que incluyen: (a) selecciones solubles; (b) selecciones realizadas bajo estrés, en las que el fago se calienta a 70°C durante 2 horas antes de la selección; y (c) selecciones competitivas, en las que se añaden dominios de antígeno o de V_H reactivos a antígeno en exceso como competición para fomentar la recuperación de dominios V_H de alta afinidad o para desviar las selecciones de un epítipo particular. Para las bibliotecas de ratones inmunizados, se llevó a cabo una ronda de selección. Sin embargo, para las bibliotecas naïf se realizaron 2-3 rondas de selección.

EJEMPLO 8. Ensayos para la unión a diana

Se examinaron V_H de las diferentes selecciones en uno o más de los siguientes ensayos para identificar V_H específicos con propiedades neutralizantes.

a) ELISA de unión

Tras las selecciones de las bibliotecas, se identificaron anticuerpos de V_H específicos mediante ELISA en fago siguiendo métodos publicados (Antibody Engineering, editado por Benny Lo, capítulo 8, págs. 161-176, 2004). Se realizaron ELISA en fago contra la proteína diana y un antígeno no relacionado como control. En algunos casos, extractos purificados o brutos de dominios V_H se sometieron a ensayo mediante ELISA en lugar de usar una ELISA en fago. En estos casos, se usaron extractos periplásmicos bacterianos o V_H purificados.

Se prepararon extractos periplásmicos bacterianos a pequeña escala a partir de cultivos de 1 ml, hechos crecer en placas de pocillos profundos. Se usaron cultivos iniciadores para inocular placas de pocillos profundos de 96 pocillos (Fisher, n.º de cat. MPA-600-030X) que contenían caldo 2XTY (Melford, M2130), suplementado con glucosa al 0,1% (p/v) + 100 µg/ml de ampicilina a 37°C con agitación a 250 rpm. Cuando la DO₆₀₀ hubo alcanzado 0,6-1, se indujo la producción de V_H añadiendo 100 µl de 2XTY, suplementado con IPTG (concentración final 1 mM) y ampicilina y se hicieron crecer los cultivos durante la noche a 30°C con agitación a 250rpm. Se sedimentaron *E. coli* mediante centrifugación a 3200 rpm durante 10 min y se desecharon los sobrenadantes. Los precipitados celulares se resuspendieron en 30-100 µl de tampón de extracción helado (sacarosa al 20% (p/v), EDTA 1 mM y Tris-HCl 50 mM pH 8,0) pipeteando cuidadosamente. Las células se incubaron en hielo durante 30 minutos y entonces se centrifugaron a 4500 rpm durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a placas de polipropileno y se usaron, tras la incubación en leche desnatada en polvo/disolución de bloqueo PBS, en el ELISA.

Los V_H purificados se obtuvieron usando la etiqueta 6xHis C-terminal de V_H para la purificación cromatográfica de afinidad en níquel-agarosa de los extractos periplásmicos. Un cultivo iniciador de cada V_H se hizo crecer durante la noche en 5 ml de caldo 2XTY (Melford, M2103) suplementado con glucosa al 2% (p/v) + 100 ug/ml de ampicilina a 30°C con agitación a 250 rpm. 50 µl de este cultivo durante la noche se usaron entonces para inocular 50 ml de 2XTY suplementado con glucosa al 2% (p/v) + 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37°C con agitación a 250 rpm durante aproximadamente 6-8 horas (hasta que $DO_{600} = 0,6-1,0$). Los cultivos se centrifugaron entonces a 3200 rpm durante 10 min y los sedimentos celulares se resuspendieron en 50 ml de caldo 2XTY nuevo que contenía 100 ug/ml de ampicilina + IPTG 1 mM. Los frascos de agitación se incubaron entonces durante la noche a 30°C y 250 rpm. Los cultivos se centrifugaron de nuevo a 3200 rpm durante 10 min y se desecharon los sobrenadantes. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 1 ml de tampón de extracción helado (sacarosa al 20% (p/v), EDTA 1 mM y Tris-HCl 50 mM pH 8,0) pipeteando cuidadosamente y entonces se añadieron 1,5 ml adicionales de tampón de extracción helado diluido a 1:5. Las células se incubaron en hielo durante 30 minutos y entonces se centrifugaron a 4500 rpm durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos Falcon de 50 ml que contenían imidazol (Sigma, I2399 - concentración final 10 mM) y 0,5 ml de perlas de níquel-agarosa (Qiagen, Ni-NTA disolución al 50%, 30210) preequilibrados con tampón PBS. Se permitió que la unión de V_H a las perlas de níquel-agarosa avanzara durante 2 horas a 4°C con agitación cuidadosa. Las perlas de níquel-agarosa se transfirieron entonces a una columna poliprep (BioRad®, 731-1550) y el sobrenadante se desechó mediante flujo por gravedad. Las columnas se lavaron entonces 3 veces con 5 ml de PBS+Tween® al 0,05% seguido de 3 lavados con 5 ml de PBS que contenía imidazol a una concentración de 20 mM. Los V_H se eluyeron entonces de las columnas mediante la adición de 250 µl de PBS que contenía imidazol a una concentración de 250 mM. El imidazol se retiró entonces de las preparaciones de V_H purificadas mediante intercambio de tampón con columnas NAP-5 (GE Healthcare, 17-0853-01) y eluyendo entonces con 1 ml de PBS. Los rendimientos de los V_H purificados se estimaron espectrofotométricamente y la pureza se evaluó usando SDS PAGE.

El ELISA de unión para V_H bruto o purificado era similar al ELISA de suero y al ELISA en fago, tal como se describieron previamente, difiriendo principalmente en las etapas de detección finales. Resumiendo, se inmovilizó antígeno sobre placas maxisorb (Nunc 443404) añadiendo volúmenes de 50 µl a 0,1 – 1 ug/ml en PBS e incubando a 4°C durante la noche. Tras el recubrimiento, se aspiró la disolución de antígeno y se lavaron las placas usando PBS (preparada a partir de comprimidos de PBS, Oxoid n.º de cat. BR0014G) suplementada con Tween® 20 al 0,05% (sigma P1379), seguido de lavados con PBS sin Tween® añadido. Para bloquear las interacciones de proteína no específicas, se añadió una disolución de leche desnatada en polvo al 3% (Marvel) en PBS a los pocillos y se incubó la placa durante al menos una hora a temperatura ambiente. Se prepararon diluciones de extracto periplásmico o V_H purificado en leche desnatada en polvo al 3%/PBS, en tubos o placas de polipropileno y se incubaron durante al menos una hora a temperatura ambiente antes de la transferencia a la placa de ELISA bloqueada, en la que tuvo lugar una incubación adicional de al menos una hora.

La proteína no unida se eliminó entonces mediante lavado usando lavados repetitivos con PBS/Tween® seguido de PBS. Una disolución de Ac anti-His conjugado con HRP (Miltényi Biotec, 130-092-785), preparada a una dilución de 1:1000 en PBS/leche desnatada en polvo al 3% se añadió entonces a cada pocillo y tuvo lugar una incubación adicional a temperatura ambiente durante al menos una hora. El anticuerpo de detección no unido se retiró mediante lavado repetido usando PBS/Tween® y PBS. El ELISA se desarrolló entonces usando sustrato de TMB (Sigma n.º de cat. T0440) y se detuvo la reacción tras 10 minutos mediante la adición de disolución de H_2SO_4 0,5 M (Sigma n.º de cat. 320501). Las absorbancias se determinaron mediante lectura a 450 nm. Datos de ELISA de ejemplo se muestran en la Figura 8.

b) Ensayo de inhibición bioquímico R/L

V_H , extractos periplásmicos tanto purificados como brutos, se sometieron también a prueba para su capacidad de inhibir la interacción de IL-17A con IL-17RA-Fc recombinante. Placas de microtitulación de 96F pocillos Maxisorb se incubaron con 50 µl de disolución de IL-17-RA 2 nM (R & D systems, n.º de cat. 177-IR-100) y se incubaron durante la noche a 4°C. Tras el lavado del antígeno de recubrimiento en exceso, tal como se describió anteriormente, los pocillos de la placa se incubaron con leche desnatada en polvo al 3%/PBS para bloquear las interacciones de proteína no específicas. Preparaciones de V_H , extractos periplásmicos brutos o V_H purificados, o controles adecuados, se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 1 hora con IL-17A recombinante 1 nM (Peprotech, n.º de cat. AF-200-17) en Marvel al 3%/disolución PBS en placas o tubos de polipropileno. La mezcla se transfirió entonces a la placa de ensayo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La proteína en exceso se retiró mediante lavado y la IL-17A unida se detectó mediante incubación con Acm anti-IL-17A biotinilado (R & D Systems, cat. BAF317) seguido de la adición de neutravidina-HRP (Pierce, n.º de cat. 31030) y sustrato de TMB (Sigma, n.º de cat. T0440). La reacción de TMB se detuvo mediante la adición de H_2SO_4 0,5 M y las absorbancias se midieron a 450 nm en un lector de placas.

Cuando fue apropiado, se usó el ajuste de curva en PRISM para determinar la CE_{50} de inhibición de V_H . Datos de ejemplo que ilustran la inhibición de respuestas de IL-17A en el ensayo bioquímico se muestran en la Figura 9. Los V_H se expresaron a partir de vector de fagémido y tienen la siguiente extensión C-terminal LEGGGS HHHHHH (SEQ ID No. 396).

c) Ensayo de inhibición basado en células R/L

Se desarrolló un ensayo para medir la capacidad de V_H de unión a IL-17A para inhibir la liberación de IL6 inducida por IL-17A a partir de la línea celular, HT1080 (ECACC n.º de cat. 85111505). La línea celular se mantuvo en crecimiento exponencial en MEM con sales de Earles, suplementado con aminoácidos no esenciales, FBS al 10%, L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina y se incubó en un incubador humidificado a 37°C, CO₂ al 5%. Para el ensayo, se sembraron 50.000 células/pocillo en una placa de cultivo tisular de fondo plano de 96 y se cultivaron durante la noche. Se prepararon diluciones en serie de V_H purificado y se incubaron a 37°C durante 1 hora con medio de cultivo/PBS suplementado con IL-17A 10 ng/ml (Peprotech n.º de cat. AF200-17). Tras la incubación, la mezcla de V_H /IL-17A (o controles adecuados) se transfirieron a las células HT1080 (de las que se había aspirado medio de cultivo) y se incubaron durante 5 horas más en el incubador de CO₂. El sobrenadante de cultivo celular se recogió y se sometió a ensayo para IL6 usando el IL-6 DuoSet (R & D Systems, n.º de cat. DY206), siguiendo las instrucciones del fabricante. Datos de ejemplo que ilustran la inhibición de respuestas de IL-17A en el ensayo basado en células se muestran en la Figura 10. Los V_H se expresaron a partir de vector de fagémido y tienen la siguiente extensión C-terminal LEGGGS HHHHHH (SEQ ID No. 396).

d) Biacore®.

Las cinéticas de unión de anticuerpos de V_H anti-IL-17A se midieron en un instrumento Biacore® T200. Se diluyó IL-17A recombinante (Peprotech AF-200-17) hasta 1 ug/ml en tampón acetato, pH 5,5 (Biacore®, n.º de cat. BR-100-52) y se acopló a un chip serie S CM5 (n.º de cat. BR-1006-68) usando química de acoplamiento de amina (kit de acoplamiento de amina NHS-EDC, n.º de cat. BR-1000-50) y el software Wizard® de inmovilización Biacore®. De este modo, se inmovilizó 100RU de IL-17A y también se preparó una superficie de blanco (sin IL-17A) para la resta de la referencia.

Las cinéticas de unión de anticuerpos de V_H anti-IL-17A se determinaron mediante cinéticas de ciclo único. Los anticuerpos de V_H se prepararon en series de dilución (normalmente series de dilución 1:3 que empiezan con V_H 100 nM a la concentración más alta), y entonces se inyectaron sobre las superficies recubiertas con antígeno y también una superficie de blanco, empezando con la concentración más baja de V_H y trabajando entonces progresivamente hasta la concentración más alta. Entonces se determinaron las cinéticas de unión de V_H a partir de los trazos de sensograma (a los que se ha restado el blanco) usando modelos de unión de 1:1 y software BIAevaluation. Trazas de unión Biacore® de ejemplo se muestran en la Figura 11. Los V_H se expresaron a partir de vector de fagémido y tienen la siguiente extensión C-terminal LEGGGS HHHHHH (SEQ ID No. 396).

Tras la cascada de examen anterior, se identificaron varios de V_H a IL-17A que demostraron propiedades inhibitoras. Estas se resumen a continuación en la tabla 8. Los clones son los clones parentales para la optimización.

Tabla 8

Antígeno diana	Fuente de V_H	Nombre de la familia	Secuencia de CDR3	CI50 bioquím. (nM)	CI50 de ensayo celular (nM)	Biacore® (afinidad)		
						ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
IL-17A	Biblioteca <i>in vitro</i> naif	Familia 3 (clon 3.1)	MDRDYYDTS GYFGWFDS SEQ ID No. 287	230	>100 0	3,427E+ 04	5,94 E-03	1,73 E-07
	Ratón inmunizado	Familia 1 (clon 1.1)	GEILPLHFDY SEQ ID No. 3	53	13	2,96E+0 5	1,49 E-03	5,0E -09
		Familia 2 (clon 2.1)	ESIFGIPED SEQ ID No. 251	32	8,3	1,22E+0 6	2,47 E-03	2,0E -09
		Familia 4 (clon 4.1)	GDTIFDGAFDI SEQ ID No.343	3140	nd	5856	2,89 E-03	4,93 E-07
		Familia 5 (clon 5.1)	QWPFFDY SEQ ID No. 347	337	nd	3,04E+0 5	5,05 E-02	1,66 E-07

EJEMPLO 9. Optimización líder de V_H **a. Optimización de V_H aislado a partir de ratones inmunizados**

Cuando fue apropiado, se usó una estrategia de optimización novedosa para aumentar las afinidades de unión de V_H aislados de ratones inmunizados. Se alinearon V_H líder con otros miembros del mismo linaje para identificar puntos

críticos de hipermutación somática seleccionados como diana durante la respuesta inmunitaria (Figura 9). La elección de aminoácidos en estas posiciones formaron la base de un nuevo enfoque de biblioteca de recombinación, y condujeron al diseño de nuevas bibliotecas que tenían el objetivo de seleccionar V_H de mayor afinidad con aminoácidos óptimos en cada punto crítico de mutación.

Como ejemplo para IL-17A, se aisló el clon 1.1 directamente de ratón inmunizado. Se mostró que este V_H se unía a IL-17A con alta afinidad (Figura 11) y se mostró que bloqueaba la unión de IL-17A al receptor. La alineación del clon 1.1 con otros miembros del mismo linaje identificó varias posiciones de aminoácido que se habían mutado durante la respuesta inmunitaria, y tanto las CDR de V_H como las regiones de entramado de V_H se vieron afectadas (Figura 12). Esta información se utilizó entonces para diseñar una nueva biblioteca de recombinación del clon 1.1 con el objetivo de identificar una variante de mayor afinidad del clon 1.1.

Tabla 9

PCR	Cebador	Secuencia	Cambios de aminoácido (posición de Kabat)	Tamaño de producto de PCR
1	V3/pel B(largo)	GCCGCTGGATTGTTATTACTC GCGGCCCAGCCGGCCATGGC CSAGGTGCAGCTGGTGGAGT CTGGGGGAGG SEQ ID No. 397	ninguno	160 pb
	53F9-33S-R	TGGCGGACCCAGTACATNYB ATACTACTAAAGGTG SEQ ID No. 398	S33 a S, G, E, R	
2	53F9-33S-F	CACCTTTAGTAGTTATVRNAT GTACTGGGTCCGCCA SEQ ID No. 52	S33 a S, G, E, R	100 pb
	53F9-57K-R	CACATAGTATTBCTCACTTCC ATCTTGNTYTATSYGGCCAC CCACTCCAG SEQ ID No. 399	N50 a N, S, D, K	
			K52 a K, E, N	
3	53F9-57K-F	CAAGATGGAAGTGAGVAATAC TATGTGGACTCTGTGA SEQ ID No. 400	K57 a K, Q, E	100 pb
			K57 a K, Q, E	
	53F9-76/79-R	AGGCTATTCATTTGCAGAWAC AGTGASTTCTTGCGTTGTCT CTG SEQ ID No. 401	N76 a N, K F79 a F, Y	
4	53F9-76/79-F	CAGAGACAACGCCAAGAAST CACTGTWTCTGCAAATGAATA GCCT SEQ ID No. 402	N76 a N, K F79 a F, Y	90 pb
	53F9-89V-R	AGTATTTCCCCTTCGCACAG TAATACACAGCCGTG SEQ ID No. 403	ninguno	
5	53F9-89V-F(largo)	CACGGCTGTGTATTACTGTGC GAAAGGGGAAATACTACCCCT	H100A a H, Y, Q Y100D a Y, H	130 pb
		CYASTTTGACYACTGGGGCCA GGGA SEQ ID No.404		

	VH_J/F (largo)	CCGTGGTGATGGTGGTGATG GCTACCGCCACCCTCGAGTG ARGAGACRGTGACC SEQ ID No. 405	ninguno	
--	----------------	--	---------	--

Se usó mezcla maestra de PCR de alta fidelidad Phusion con tampón HF (n.º de cat. F531L, NEB) para las reacciones de PCR que se configuraron para cada emparejamiento de cebador tal como sigue:

Mezcla Phusion HF 2x	25 µl
Cebadores (10 uM)	1,25 µl de cada uno (emparejamientos tal como en la tabla)
ADN de plásmido 53F9 (34 ng/ul)	0,5 µl
H ₂ O libre de nucleasa	hasta un volumen final de 50 µl

5

La PCR se realizó tal como sigue;

98°C 30 s	
98°C 10 s	
58°C 20 s	} 31 ciclos
72°C 20 s	
72°C 10 min	
mantenimiento a 10°C	

10

Los productos de cada PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1%. Cada producto se purificó entonces usando el kit de purificación de PCR Fermentas (K0701) en 40 ul de tampón de elución. Entonces se fijaron PCR de ensamblaje hasta reconstruir la secuencia de V_H completa:

Mezcla Phusion HF 2x	25 µl
Producto de PCR purificado 1	5 µl
Producto de PCR purificado 2	5 µl
Producto de PCR purificado 3	5 µl
Producto de PCR purificado 4	5 µl
Producto de PCR purificado 5	5 µl

15

La PCR se realizó tal como sigue;

98°C 30 s	
98°C 10 s	
58°C 20 s	} 5 ciclos
72°C 20 s	

20

Se añadieron 0,5 ul de los cebadores V3/pelB (largo) y V_H_J/F (largo) (ambos 10 uM) a la reacción y entonces se continuó durante 10 ciclos de PCR más en las condiciones anteriores. El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa al 1% y se purificó usando el kit de purificación de PCR Fermentas en 40 ul de tampón de elución. El producto de PCR se usó entonces como megacebador para la construcción de bibliotecas tal como se describió anteriormente en el ejemplo 5, parte b. Entonces se realizaron selecciones de presentación en fago y examen de V_H tal como se describe en los ejemplos 7 y 8, tras lo cual se aislaron varias nuevas variantes del clon 1.1 con afinidades mejoradas hasta 10 veces (clones 1.10, 1.6, 1.7).

b. Optimización de V_H aislado a partir de bibliotecas *in vitro* naif

Para V_H anti-IL-17A aislado a partir de bibliotecas de presentación en fago *in vitro* naif, se emplearon varias estrategias diferentes para aumentar la afinidad de V_H para el antígeno, cuya elección y combinación se impulsaron mediante la potencia de partida del V_H en cuestión. Varias de las estrategias de optimización usadas ya se describen en la técnica e incluyen:

a) Intercambio (Antibody Engineering, editado por Benny Lo, capítulo 19, págs. 327-343, 2004), aunque en nuestro caso los dominios de CDR1 y CDR2 se intercambiaron mientras conservaban la secuencia de CDR3 de V_H. Los dominios de CDR1 y CDR2 de V_H se amplificaron a partir de ADNc humano (Clontech) mediante PCR, y entonces se ensamblaron con la secuencia de V_H para generar una biblioteca de V_H con dominios de CDR3 idénticos, pero regiones CDR1 y CDR2 diversificadas. Entonces se utilizó la tecnología de presentación en fago para aislar V_H de mayor afinidad, siguiendo normalmente los mismos procesos de selección que se describen en la sección 7 anterior.

b) Aleatorización seleccionada como diana de regiones CDR3 usando oligonucleótidos aleatorizados y tecnología de presentación en fago (Main *et al.*, J Pharmacol Exp Ther. diciembre de 2006; 319(3): 1395-404.)

c. Optimización de V_H mediante mutagénesis propensa a errores y presentación en ribosoma

Se usaron mutagénesis propensa a errores y presentación en ribosoma para optimizar las afinidades de V_H aislados a partir de bibliotecas de presentación en fago *in vitro* naif y, cuando fue apropiado, V_H de ratones inmunizados. Las reacciones de PCR propensa a errores, el ensamblaje con el fragmento cK y la preparación de moldes de ARN para la presentación en ribosoma se realizaron tal como se describió previamente (Edwards BM, He M, Methods Mol. Biol. 2012; 907: 281-92). El método se adaptó entonces para facilitar selecciones en disolución y dar un mayor control de la concentración de antígeno durante las selecciones.

Tabla 10 Cebadores

CKF/f	GCACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGAGCTCAGGCCCTGATGG GTGACTTCGCAGGCGTAGAC SEQ ID No. 406
Gaga2 G	GCAGCTAATACGACTCACTATAGGGAGACAGACCACCATGG SEQ ID No. 407
CK/f	GCACTCTCCCCTGTTGAAGCT SEQ ID No. 408

Se realizaron selecciones de presentación en ribosoma basados en disolución con perlas magnéticas de estreptavidina (Dynabeads M280, Invitrogen) que se bloquearon previamente tal como sigue. El volumen requerido de perlas (normalmente 100 ul por selección) se transfirió a un tubo de 1,5 ml siliconado (Sigma T3406) y entonces se lavó en tampón de lavado (PBS que contenía Tween® 20 al 0,05% y MgAc 5 mM, almacenado a 4°C), entonces de nuevo en PBS antes de resuspenderlo finalmente en 100 ul de BSA al 1% en PBS + 2 ul de ARN de *S. cerevisiae* (Sigma 83847, preparado a 10 mg/ml en agua libre de RNasa, almacenado a -20°C) + 20 ul de heparina (Sigma, n.º de cat. H3393, 250 mg/ml de disolución de reserva, almacenado a -20°C) e incubar mezclando en una mesa giratoria a 4°C durante >1 hora.

La traducción *in vitro* del molde de ARN de biblioteca para preparar los complejos de ribosoma se llevó a cabo tal como se describe (Edwards BM, He M, Methods Mol. Biol. 2012; 907: 281-92), usando 5 ug de molde de ARNm por selección. Tras completar la etapa de traducción *in vitro*, las reacciones se diluyeron en tampón de bloqueo para ayudar a estabilizar los complejos de ribosoma antes de la selección. Se preparó tampón de bloqueo mediante la adición de 100 ul de 10 x BPM (10% del BSA, MgAc 10 mM en 10xPBST) a 400 ul de tampón de dilución (glutación reducido 5 mM, glutación oxidado 5 mM y MgAc 13 mM), que contenían 10 ul de disolución de reserva de heparina y 1 ul de disolución de reserva de ARN de *S. cerevisiae*.

Tras la incubación con el tampón de bloqueo durante 5 min en hielo, la reacción se centrifugó entonces a 14000 g durante 5min a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo siliconado de 0,5 ml enfriado previamente para la selección. Para la primera ronda de selección, se añadió antígeno biotinilado a la mezcla para una concentración final de 200 mM y se incubó mezclando en una mesa giratoria a 4°C durante 2 horas.

Se recuperaron complejos unidos a antígeno de la mezcla de selección mediante la adición de las perlas de estreptavidina bloqueadas previamente, incubando mediante rotación durante 15min a 4°C, y entonces los complejos unidos hicieron bajar usando un imán. Las perlas magnéticas se lavaron entonces 5 veces con tampón de lavado, 400 ul por lavado, incubando hasta 30 min a 4°C. Se llevó a cabo un lavado rápido final de 400 ul de MgAc 5 mM helado antes de resuspender las perlas en 100 ul de MgAc 5 mM. La elución y la purificación de ARN de las perlas se llevaron a cabo usando un kit RNeasy® Minelute (Qiagen 74204), añadiendo 350 ul de tampón RLT a las perlas, mezclando bien, añadiendo entonces etanol al 100% y mezclando bien mediante pipeteo. Las perlas se llevaron entonces a un

lado con un imán y el sobrenadante restante se añadió a la columna minielute en un tubo de recogida de 2 ml, y se centrifugó inmediatamente a 8000 g durante 15 s. La columna se puso en un nuevo tubo de recogida y las etapas restantes desde la adición de tampón RPE hasta la columna en adelante se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante.

5

El ARN eluido se convirtió a ADNc usando transcriptasa inversa Revertaid H Minus (Fermentas EP0451):

Eluato	6 µl
Cebador CKF/f (10 uM)	1,6 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
agua	2,9 µl

10

La reacción se incubó a 65°C durante 5 min, antes de transferirla a hielo durante > 3 min. Entonces se añadieron a la mezcla 8 µl de la siguiente mezcla:

5 x tampón de reacción	4 µl
Agua	2 µl
Rnasein Plus	1 µl (Promega, n.º de cat. N2611)
RevertAid H Minus RT	1 µl

15

La reacción se mezcló y se hizo girar hacia abajo brevemente antes de incubar a 42°C durante 60 min, seguido de 10 min a 70°C. La recuperación por PCR del ADNc se llevó a cabo entonces usando el kit de PCR de Taq polimerasa (Qiagen 201203) tal como sigue:

10 x tampón	80 µl
5xQ	160 µl
dNTPS (2,5 mM)	64 µl
Cebador Gaga2G	38,4 µl
Cebador Ck/F	38,4 µl
RT	8 µl
Taq polimerasa	4 µl
Agua	407,2 µl

La reacción se dividió entre 16 tubos de PCR de 50 µl cada uno y la reacción se sometió a un ciclo tal como sigue:

94°C 5 min	} 20-30 ciclos
94°C 30 s	
59°C 30 s	
72°C 1 min	
72°C 8 min	
mantenimiento a 4°C	

20

Los productos en el intervalo de 700 pb se confirmaron mediante electroforesis en gel y las reacciones de PCR se agruparon y se purificaron usando columnas de purificación de PCR Wizard® SV (Promega A9281). Los productos de PCR se usaron directamente para preparar moldes de ARN para rondas de selección posteriores, tal como se describió anteriormente.

25

Se realizaron rondas de selección posteriores con rigurosidad creciente, por ejemplo, disminuyendo la concentración de antígeno y acortando la duración de tiempo que los complejos se incubaron con antígeno biotinilado. Además, las etapas de lavado aumentaron o bien en duración o bien en número, o ambos. También se usaron selecciones de tasa

de disociación tras las etapas de lavado, en las que los complejos y las perlas se incubaron con un exceso molar de 100 a 1000 veces de antígeno no biotinilado a 4°C durante > 2 horas.

- 5 Otras modificaciones al protocolo para rondas de selección posteriores incluyeron una etapa de preselección para eliminar los complejos de ribosoma que se unían de manera no específica a las perlas de estreptavidina. Esto se llevó a cabo incubando las mezclas de traducción *in vitro* con perlas de estreptavidina antes de la selección (perlas preparadas tal como anteriormente, unión durante 1 hora a 4°C). Las perlas se capturaron entonces y la mezcla de traducción se transfirió a un tubo siliconado de 1,5 ml limpio y se añadió antígeno biotinilado para la selección.

- 10 Tras las etapas de optimización líder, las potencias de los V_H mejorados eran tal como sigue:

a)

- 15 **Tabla 11** V_H producido tras la optimización de la familia 3 de V_H anti-IL-17A (clon parental 3.1 derivado de biblioteca naïf *in vitro*)

Nombre de V _H	Secuencia de CDR3	Cl ₅₀ bioquím. (nM)	Cl ₅₀ de ensayo celular (nM)	BIAcore (afinidad)		
				ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Clon parental 3.1	MDRDYYDTSGYFGWFDS SEQ ID NO. 287	230	>1000	3,427E+04	5,94E-03	1,73E-07
Clon 3.3	MDRDYYDTSGYFGWFDS SEQ ID NO. 295	271	106	9,981E+04	2,85E-03	2,90E-08
Clon 3.5	LDRDWRSPNDYFGWFDS SEQ ID NO. 303	4	26	2,81E+05	6,19E-04	2,20E-09
Clon 3.6	LDRDWRSPNDYYGWFDSD SEQ ID NO. 307	3	28	5,73E+05	4,80E-04	8,38E-10
Clon 3.9	MDRDYYDTSGYFGWFDS SEQ ID NO. 319	43	182	9,643E+04	0,002,01E-03	2,10E-08
3.11	LDRDTWYPHSYFGWFDS SEQ ID NO. 327	8	17	5,38E+05	2,37E-04	4,40E-10
Clon 3.13	LDRDTWYPHSYAGWFDS SEQ ID NO. 335	2	5	1,02E+06	2,01E-04	1,97E-10
Clon 3.2	LDRDTWYPHSYAGWFDA SEQ ID NO. 291	2,5	2,5	1,10E+06	2,52E-04	2,30E-10

b)

- 20 **Tabla 12** V_H producidos tras la optimización de la familia 1 de V_H anti-IL-17A (parental derivado de ratón TKO inmunizado tal como se describió anteriormente)

Nombre de V _H	Secuencia de CDR3	IC50 de ensayo celular (nM)	BIAcore® (afinidad)		
			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Clon 1.1	GEILPLHFDY SEQ ID NO. 3	13	2,96E+05	1,49E-03	5,0E-09
Clon 1.6	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 23	1,3	7,70E+05	4,82E-04	6,27E-10
Clon 1.7	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 27	2,0	7,65E+05	4,66E-04	6,09E-10
Clon 1.8	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 31	1,2	6,97E+05	4,29E-04	6,16E-10
Clon 1.9	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 35	2,4	8,77E+05	4,64E-04	5,29E-10
Clon 1.10	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 39	1,9	6,64E+05	9,66E-04	1,46E-09
Clon 1.11	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 43	1,5	6,17E+05	5,21E-04	8,45E-10
Clon 1.12	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 47	1,4	7,32E+05	5,30E-04	7,24E-10
Clon 1.13	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 51	1,2	6,14E+05	5,15E-04	8,40E-10
Clon 1.14	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 55	2,9	7,53E+05	6,88E-04	9,13E-10

Nombre de V _H	Secuencia de CDR3	IC50 de ensayo celular (nM)	BIAcore® (afinidad)		
			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Clon 1.3 prep. 1	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 11	1,8	9,64E+05	2,22E-04	2,30E-10
Clon 1.15	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 59	2,5	1,04E+06	2,42E-04	2,32E-10
Clon 1.16	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 63	1,4	9,86E+05	2,13E-04	2,16E-10
Clon 1.17	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 67	1,91	9,23E+05	4,62E-04	5,00E-10
Clon 1.18	GEILPLYFDY SEQ ID NO.71	1,04	1,31E+06	4,79E-04	3,66E-10
Clon 1.19	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 75	1,2	7,14E+05	1,53E-04	2,15E-10
Clon 1.20	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 79	2,03	8,51E+05	2,08E-04	2,44E-10
Clon 1.21	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 83	2,05	7,92E+05	2,05E-04	2,59E-10
Clon 1.22	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 87	3,25	5,65E+05	1,26E-04	2,23E-10
Clon 1.3 prep. 2	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 11	0,57	7,99E+05	5,01E-04	6,27E-10
Clon 1.2	GEILPLYFDY SEQ ID NO. 6	0,4	8,74E+05	4,85E-04	5,55E-10

Los V_H optimizados muestran afinidades mejoradas para IL-17 y potencias mejoradas en el ensayo basado en células de IL-17 debido a tasas de disociación más lentas (Figura 11). Los V_H se expresaron a partir de vector de fagémido y tienen la siguiente extensión C-terminal LEGGGS HHHHHH (SEQ ID No.396).

5

EJEMPLO 10 - Caracterización de V_H

a. Especificidad de anti-IL-17A

La especificidad de V_H individuales para antígeno diana se confirmó mediante ELISA, siguiendo los métodos descritos en el ejemplo 8(a). Los V_H se sometieron a prueba para la unión a IL-17A y se mostró que no reaccionaban de manera cruzada con los relativos cercanos tales como IL-17C e IL-17F. Además, también se demostró la unión a homólogos de especie (IL-17A murina) (Figura 13). Los V_H se expresaron a partir de vector de fagémido y tienen la siguiente extensión C-terminal LEGGGS HHHHHH (SEQ ID No. 396).

15

b. Mapeo de epítomos

Se mostró que los V_H se unían a epítomos únicos de IL-17A usando un instrumento BIAcore® T200. Se iniciaron sensogramas manuales a 30 ul/min en tampón HBS y los V_H se inyectaron según fue apropiado sobre el chip CM5 acoplado a IL-17A, más una superficie de blanco para la resta de la referencia (Figura 14). Los V_H se expresaron a partir de vector de fagémido y tienen la siguiente extensión C-terminal LEGGGS HHHHHH (SEQ ID No. 396).

20

Para IL-17A, se prepararon muestras de V_H a 4 ug/ml en tampón HBS y entonces el primer V_H se inyectó sobre la superficie acoplada a IL-17A durante 120 segundos. Tras la unión del primer V_H, tampón HBS solo se inyectó sobre la superficie durante 60 segundos, tras lo cual se inyectó el segundo V_H durante 120 segundos. Si los V_H competían por el mismo epítipo, entonces no se observaría ninguna unión con el segundo anticuerpo v. Los V_H no competitivos podrían unirse ambos simultáneamente a la superficie acoplada a IL-17A. Se muestran datos de competición de epítomos (Figura 14). La superficie se regeneró inyectando glicina pH 1,5 durante 10 segundos y entonces se repitió el proceso para diferentes pares de anticuerpo.

25

30

c. Cromatografía de exclusión de tamaño con HPLC

V_H purificados se sometieron a cromatografía de exclusión de tamaño. Resumiendo, los V_H purificados se analizaron usando un módulo de separación Waters® 2795 con un detector de absorbancia Waters® 2487 Dual λ - (detectado a 280 nM) y una columna TSKgel G2000SWXL (TOSO). Las muestras se inyectaron en volúmenes de 10-50 ul y se ejecutaron en fases móviles de o bien el 10% de isopropanol/el 90% de PBS o bien tampón fosfato 100 mM, pH 6,8, NaCl 150 mM a una tasa de flujo de 0,5 ml/min – 0,7 ml/min. Se recogieron datos durante hasta 35 minutos y el tamaño de la fracción de V_H se comparó con estándares conocidos (véase la Figura 15). Los V_H analizados se expresaron a partir de vector de fagémido y tienen la siguiente extensión C-terminal LEGGGS HHHHHH (SEQ ID No. 396).

35

40

EJEMPLO 11

Estudio de penetración en la piel

El dominio V_H usado en los experimentos fue el clon 1.10.2. El clon 1.10.2 tiene una secuencia de V_H tal como se muestra en la Figura 1, pero incluye residuos C-terminales adicionales (SEQ ID No. 409). Usando un vector de

45

expresión recombinante de *E. coli* estándar, se llevó a cabo la expresión de proteína en condiciones de modo discontinuo estándar en medios ricos en un fermentador de 25 l. La expresión se impulsó mediante un promotor inducido por IPTG y se secretó en los medios mediante una secuencia señal OmpA. El V_H se modificó para portar una etiqueta His C-terminal (6xHis) que se usó para la purificación y la detección en formación de imágenes de IHC e inmunotransferencias de tipo Western posteriores.

El V_H en los medios de fermentación se aclaró mediante centrifugación y se purificó usando cromatografía de afinidad Ni²⁺ seguido de la concentración de proteína y una etapa de purificación SEC final en Superdex[®] 75. Se cambió el tampón del V_H a PBS, pH 7,4 y se concentró hasta 20 mg/ml.

En un estudio previo, se evaluó la calidad de los discos de piel que debían usarse en estudios posteriores (en particular, para evaluar cualquier impacto potencial del proceso de congelación). Cada una de las dos formulaciones de vehículo potenciales (PBS y DMSO al 35%) se incubaron sobre discos de piel intactos y sometidos a abrasión (abrasión con cinta) durante 24 horas a 32°C, entonces se fijaron en formalina al 10% y se almacenaron en etanol al 70% a temperatura ambiente. Además, se fijó una muestra en cada caso de piel intacta y sometida a abrasión con cinta (tal como anteriormente) sin incubación previa con ningún vehículo. La estructura de las muestras de piel fijada se evaluó posteriormente mediante IHC.

Protocolos:

Fijación en formalina de tejidos

Para elaborar 1 l de formalina al 10% (v/v):

100 ml de formaldehído al 37%

900 ml de PBSc

Para elaborar 1 l de PBSc (PBS, MgCl₂ 0,5 mM, CaCl₂ 0,9 mM):

1 l de PBS

0,5 ml de MgCl₂ 1 M

0,9 ml de CaCl₂ 1 M

Protocolo de fijación:

1) Cada muestra se puso en un vial y se cubrió hasta una altura de al menos 1 cm por encima del espécimen con formalina al 10%.

2) Entonces se permitió que la muestra se fijase a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo establecido dependiendo de su tamaño (véase a continuación).

<1 cm³ 18 horas

1-3 cm³ 48 horas

3) Inmediatamente tras la fijación, el agente de fijación se reemplazó por el mismo volumen de etanol al 70%. En esta fase, el tejido podía almacenarse de manera indefinida si no se requería un procesamiento inmediato.

Inmunohistoquímica (IHC)

Para exponer el área incubada del disco de piel, cada disco se cortó por la mitad y ambas mitades se pusieron en un casete de imbibición (Cell Path, #EAD-0107-03A y #EAD-0102-03A). Las muestras se deshidrataron haciéndolas pasar a través de una serie de alcoholes (etanol al 70% y al 100% (VWR #20821.330), propan-2-ol al 100% (Fisher #P/7500/PB17)) y xileno (xileno al 100% (Fisher #X/0250/PB17)) y se infiltraron posteriormente con cera de parafina. Las muestras se embebieron en cera de parafina, se orientaron de modo que el borde de corte de cada mitad fuera el primer tejido expuesto. Se cortaron secciones de 5 µm de cada bloque sobre portaobjetos de vidrio. También se cortó una sección de 5 µm de la piel humana normal suministrada comercialmente (AMSBio #500041022). Esta muestra no se congeló antes de la fijación. La estructura tisular de las muestras de prueba congeladas previamente se comparó con esta piel control. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) usando el protocolo a continuación para visualizar la estructura tisular. Se tomaron imágenes de las muestras de piel a dos aumentos.

Protocolo de tinción con hematoxilina y eosina

Secciones de portaobjetos se desparafinaron y se rehidrataron en una serie de lavados con xileno y etanol tal como sigue:

Xileno	10 min
Xileno	10 min
Xileno	1 min
Xileno	1 min
Etanol al 100%	1 min
Etanol al 100%	1 min
Etanol al 100%	1 min
Etanol al 70%	1 min

- 5 Los portaobjetos se lavaron en agua del grifo corriente durante 1 min, entonces se transfirieron a hematoxilina de Mayer durante 2 min y se lavaron en agua del grifo corriente durante 1 min. Los portaobjetos se "pasaron a azul" colocándolos en agua de Scott durante 1 min y se lavaron en agua del grifo corriente durante 1 min. Los portaobjetos se transfirieron posteriormente a eosina (Raymond A Lamb; LAMB/100-D) durante 30 s y se lavaron en agua del grifo corriente durante 1 min, tras lo cual se deshidrataron y se aclararon a través de una serie de lavados con etanol y xileno tal como sigue:

Etanol al 70%	1 min
Etanol abs.	1 min
Etanol abs.	1 min
Etanol abs.	1 min
Xileno	1 min
Xileno	1 min

- 15 Los portaobjetos se sumergieron en Histoclear (Fisher Scientific; H/0468/17) y se montaron inmediatamente en medio de montaje DPX (Cell Path; SEA-0304-00A)

Hematoxilina de Mayer:

- 20 Disolución 1: 3 g de hematoxilina (BDH; 340374T) en 20 ml de etanol absoluto disolución 2: 0,3 g de yodato de sodio (Sigma S-4007), 1 g de ácido cítrico (Fisher Scientific C/6200/53), 50 g de hidrato de cloral (Fisher Scientific C/4280/53), 50 g de sulfato de aluminio-potasio (Sigma 237086), 850 ml de dH₂O. Los reactivos se añadieron secuencialmente, se mezclaron bien para garantizar que todos se han disuelto. La disolución 1 se añadió a la disolución 2 y se mezclaron bien. Finalmente se añadieron 120 ml de glicerol (Fisher Scientific G/0650/17), se mezclaron bien y se almacenaron en una botella oscurecida. La mezcla final se filtró siempre inmediatamente antes de uso. Agua de grifo de Scotts: agua del grifo con MgSO₄ al 2% (Sigma M7506) y NaHCO₃ al 0,35% (Sigma S-6297).

Resultados:

- 30 Muestra 1 Control intacto
- Muestra 2 Control sometido a abrasión con cinta
- Muestra 3 PBS intacta
- 35 Muestra 4 PBS sometida a abrasión con cinta
- Muestra 5 DMSO intacto
- Muestra 6 DMSO sometido a abrasión con cinta
- 40 Tanto a baja como a alta potencia, la estructura de la epidermis y la dermis no parecía diferir significativamente entre las muestras congeladas previamente y la muestra control no congelada. No hubo separación de la epidermis de la dermis y se observó que el colágeno estaba empaquetado densamente dentro de la dermis de las muestras congeladas como en el control no congelado.

- 5 Las muestras de piel no incubadas con vehículo y aquellas incubadas con PBS o DMSO (muestras 3 a 6) mostraron todas una arquitectura normal cuando se compararon con la muestra control no congelada. La IHC de la piel sometida a abrasión con cinta identificó claramente la reducción esperada en el grado del estrato córneo en comparación con las muestras intactas.
- Los resultados anteriores sugieren que los tratamientos usados en el estudio de penetración en la piel eran adecuados para conservar una arquitectura tisular intacta.
- 10 Los experimentos de penetración usaron un sistema de células de difusión de flujo a través Bronaugh. En este sistema, un pequeño disco de piel humana dermatomizada se sujetó por apriete entre una cámara superior ("donadora") y una cámara inferior ("receptora") (conteniendo la última un fluido receptor que permanece en contacto con el lado inferior de la muestra de piel). La formulación de prueba que contenía V_H aplicada a la superficie superior (estrato córneo) de la piel solo era capaz de moverse desde la cámara donadora a la cámara receptora si había entrado primero y entonces
- 15 atravesado el grosor completo de la muestra de piel. El beneficio de usar el sistema Bronaugh con respecto a otro aparato similar (por ejemplo, la célula Franz) es que ofrece las ventajas de una perfusión continua del lado inferior de la muestra de piel, con fluido receptor nuevo para mantener condiciones de sumidero cuando se evalúan fármacos que penetran en la piel.
- 20 Evaluación de la capacidad de diversas formulaciones prototipo para facilitar la penetración de V_H en muestras de piel (intactas y sometidas a abrasión con cinta). La meta principal de este estudio era imágenes de IHC que muestran V_H en la piel.
- 25 Toda la piel humana se obtuvo siguiendo cirugía electiva y se preparó en el plazo de 24 horas de la extirpación. El tejido preparado se almacenó posteriormente congelado (menos 20°C) en paquetes a vacío sellados antes de su uso. Se midió el grosor real de la piel dermatomizada y se registró en el momento de uso con un calibre rápido micrométrico. Una indicación clínica potencial de interés para un V_H aplicado tópicamente es el tratamiento de pacientes con psoriasis. Los pacientes con psoriasis tratan de manera rutinaria su placas con un agente queratolítico (por ejemplo, ácido salicílico) ya sea como monoterapia o combinado con otras terapias tales como esteroides tópicos. Los agentes
- 30 queratolíticos ayudan a eliminar las escamas o hiperqueratosis y pueden facilitar la penetración de otros agentes tópicos. El mejor modo para imitar piel psoriásica tratada previamente con un agente queratolítico es someter a abrasión ligeramente (abrasión con cinta) la piel con el fin de retirar parte del estrato córneo. Esto se consiguió aplicando y retirando repetidamente piezas de cinta adhesiva (20-30 veces) a/de la piel con el fin de comprometer la función de barrera del estrato córneo.
- 35 El estudio de penetración en la piel *in vitro* evaluó la capacidad relativa de cada una de las formulaciones en la tabla a continuación para facilitar la penetración de V_H en piel intacta o sometida a abrasión con cinta usando células de flujo a través Bronaugh.
- 40 El estudio se realizó con piel humana dermatomizada de un único donante. La piel se obtuvo y se preparó tal como se detalla más adelante. Las muestras de cada formulación se prepararon inmediatamente antes de su uso en el estudio.

Tabla 13 Composición de formulaciones prototipo usadas en el estudio de penetración en la piel *in vitro*

Componentes	% p/p									
	100	10	65,0							...
Disolución de V _H al 2% en tampón										
Formulación	C1 4077-18A	C2 4077-18B	C3 4077-18C	1 4077-19A	2 4077-19B	3 4077-19C	4 4077-20A	5 4077-20B	6 4077-21 (placebo)	...
Microemulsión	...	90,0	...	...	...	...	...	...	...	...
DMSO	...	...	35,0	...	...	...	...	...	...	...
Propilenglicol	...	...	...	35,0	...	25,0	20,0	...	25,0	...
Transcutol®	...	...	...	...	24,0	...	...	...	...	...
Etanol	...	...	...	...	...	10,0	...	...	10,0	...
Miristato de isopropilo	...	...	...	...	...	...	10,0	...	...	...
Azone* (laurocapram)	...	...	...	...	...	...	...	10,0	...	...
Steareth-21 (Brij® 721)	...	...	...	...	...	...	3,0	3,0	...	...
Steareth-2 Brij® 72)	...	...	...	...	...	...	2,0	2,0	...	...
PBS pH 7,4 (c.s)	...	...	...	...	11,0	...	...	20,0	65,0	...
Observaciones	Clara	Turbia	Clara	Clara	Clara	Clara	Blanca; espesa	Blanca; aguada	Clara	...
Prototipo	Control		Disolución							Disolución

Potenciador
de la
penetraciónTensioactivo
no iónico
insoluble en
agua

Diseño/Formulación del estudio

Tipo de tejido: Piel humana dermatomizada de un único donante

Tipo de células: 54 células de difusión de flujo a través (diseño Bronaugh con 0,9 cm de diámetro o 0.64 cm² de área)

Temperatura de las células: 32°C

Fase receptora (RP): PBS, pH 7,4, con azida de sodio al 0,1% (p/v)

Puntos de recogida de RP: 0-6, 6-12, 12-18 y 18-24 horas

Tasa de flujo de RP: 0,25 ml/h.

Nivel de dosis: Dosis infinita: 500 mg de formulación por célula

Tabla 14

	Formulación de prueba	Número de células Bronaugh
Piel intacta	A: Vehículo 1: PBS	1
	B: Vehículo 2: DMSO	1
	C: Vehículo 3: Vehículo prototipo 3	1
	D: Control de IgG	2
	E: Control de C1-VH PBS	2
	F: Control de microemulsión C2-VH	3
	G: Control de C3-VH DMSO	2
	H: Prototipo 1	3
	I: Prototipo 2	3
	J: Prototipo 3	3
	K: Prototipo 4	3
	L: Prototipo 5	3
Piel sometida a abrasión con cinta (TS)	M: Vehículo 1: PBS	1
	N: Vehículo 2: DMSO	1
	O: Vehículo 3: Vehículo prototipo 3	1
	P: Control de IgG	2
	Q: Control de C1-VH PBS	2
	R: Control de microemulsión de C2-VH	3
	S: Control de C3-VH DMSO	2
	T: Prototipo 1	3
	U: Prototipo 2	3
	V: Prototipo 3	3
	W: Prototipo 4	3
	X: Prototipo 5	3

Preparación del tejido

Piel normal: La piel humana se obtuvo tras cirugía electiva y se preparó en el plazo de 24 horas de la extirpación. El tejido preparado se almacenó posteriormente congelado (a menos 20°C) en paquetes a vacío sellados antes de su uso. Se midió el grosor real de la piel dermatomizada y se registró en el momento de uso en múltiples sitios aleatorios con un calibre rápido micrométrico con el fin de determinar el intervalo de grosor de la piel.

Piel sometida a abrasión con cinta: Muestras de la piel normal, preparadas tal como anteriormente, se sometieron a abrasión con cinta repetidamente (treinta veces) con piezas individuales de cinta adhesiva para comprometer la función de barrera del estrato córneo.

- 5 Inmediatamente antes de su uso, las muestras de piel se cortaron en discos del tamaño correcto y se ensamblaron en las células Bronaugh con el estrato córneo lo más arriba.

Detalles experimentales

10 **Dosificación de material de prueba:**

- Se prepararon muestras de cada formulación de prueba y controles (detallados en la tabla 13) inmediatamente antes de su uso en el estudio. La dosificación de las formulaciones prototipo se escalonó por los sistemas de distribución de células de difusión. Aproximadamente 500 mg de cada formulación se dispensaron sobre la piel, la masa exacta se
15 determinó en peso. Tras la dosificación, la células se ocluyeron con Parafilm y permanecieron inalteradas a 32°C durante el periodo de exposición de 24 horas.

Preparación y análisis de las muestras:

- 20 La muestra de piel en cada célula Bronaugh se mantuvo con su superficie inferior en contacto con fluido receptor compuesto por PBS, pH 7,4, con azida de sodio al 0,1% (p/v). El fluido receptor se bombeó para que fluyera a través de cada cámara receptora a 0,25 ml/h. Se recogieron muestras de fase receptora automáticamente con recogida continua a intervalos de seis horas. Cada 6 horas, el colector de fracciones automático se hizo rotar para alinearse con un nuevo vial de centelleo de 20 ml bajo la célula que recoge las siguientes seis horas de muestra. Todas las
25 muestras se recogieron en viales de centelleo pesados previamente, se tomaron los pesos tras la recogida y se registró la diferencia como el peso de fase receptora recogida.

- Tras el periodo de exposición de 24 horas, las cámaras Bronaugh se desmontaron tras la retirada de disolución donadora sin contaminar el fluido receptor con el fluido donador, las muestras de piel se retiraron de sus respectivas
30 cámaras Bronaugh y cada una se fijó en formalina tal como se describió en el estudio previo.

Todas las muestras de fase receptora se empaquetaron en viales de centello de plástico y se congelaron a - 80°C hasta el análisis ELISA posterior.

35 **ELISA:**

El método ELISA usado fue el mismo que se usó en los estudios previos a la formulación, excepto que cada muestra de fluido receptor se preparó a 2 concentraciones: (a) pura (50 µl de fluido receptor más 10 µl de Marvel al 18%, 6xPBS), y (b) dilución 1:100 (2 µl de fluido receptor más 198 µl de Marvel al 3% /PBS).

- 40 Resultados del análisis de fluido receptor

- Se tomaron muestras del fluido receptor en cuatro puntos de tiempo de cada célula Bronaugh durante el estudio de penetración (a las 6 h, 12 h, 18 h y 24 h). Todas se sometieron a prueba mediante ELISA para determinar si el V_H aplicado a la superficie superior (estrato córneo) de la piel había entrado en y pasado a través de la muestra de piel o no. Los resultados del ELISA se muestran en la Figura 17 para piel intacta y la Figura 18 para piel sometida a abrasión con cinta. Cuando se registró una señal de ELISA positiva, las variaciones en el tamaño de la señal de ELISA derivada de células que contenían V_H en diferentes formulaciones indicaban que la capacidad de los diferentes potenciadores de la penetración en cada formulación prototipo para facilitar la penetración del V_H a través del estrato córneo y
50 adicionalmente al interior de la epidermis y la dermis variaba.

Resultados de formación de imágenes de IHC de V_H en las muestras de piel

- Ejemplos de imágenes de IHC de piel tratada con V_H en las formulaciones prototipo se muestran en la Figura 19 a la
55 Figura 28. Era posible ver el etiquetado de V_H por toda la profundidad de la muestra de piel. Además, había una correlación positiva general entre la escala de etiquetado de V_H observada en la imagen de IHC y la señal de ELISA medida en los fluidos receptores derivados de las células Bronaugh correspondientes. De manera importante, la IgG de control de tamaño no cruzaba el estrato córneo ni penetraba adicionalmente en la piel en absoluto, ni en la piel normal ni en la sometida a abrasión con cinta, respaldando el hecho de que solo el dominio V_H mucho más pequeño era capaz de penetrar a través del estrato córneo en la epidermis.

Ejemplo 12

- 65 Dos V_H anti-IL-17A idénticos o dos diferentes pueden unirse entre sí en tándem directamente o por medio de un ligador proteico. Si los dos V_H unidos actúan cada uno sobre el mismo epítipo de IL17A, el V_H - V_H unido se denomina bivalente. Si los dos V_H unidos actúan cada uno sobre diferentes epítopos de IL-1A7, el V_H - V_H unido se denomina biparatópico.

Se usan técnicas de clonación de biología molecular estándar para clonar las secuencias de ADN codificantes de los dos V_H y el ligador en formato V_H-ligador-V_H con etiqueta HIS6 C-terminal en vector de expresión de *E. coli* o levadura (*Pichia pastoris*). La expresión y la purificación de los productos de V_H-V_H etiquetados con HIS6 siguen métodos de expresión y purificación de proteína estándar.

Se elaboraron varios constructos y los resultados se muestran en las figuras. Los constructos usan los clones 1.1, 1.10, 1.2 y 3.2.

Bivalente:	1,10-3(G ₄ S)-1,1
Secuencia ligadora:	GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 426)

Secuencia de ADN:

Biparatópico:	3,2-2(G ₄ S)-1,2; 3,2-4(G ₄ S)-1,2; 3,2-6(G ₄ S)-1,2;
Secuencias ligadoras:	AAGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 427)
	AAGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 428)
	AAGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 429)

Los V_H-V_H purificados se han sometido a prueba en BIAcore® para la afinidad de unión a IL1A7. La funcionalidad se ha analizado en el ensayo de liberación de IL6.

Información de secuencias

SEQ ID No. 409 1.10.2 (clon 1.10 con extensión C-terminal y etiqueta His)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYRMYWVRQAPGKGLEWVASIEQDG
SEYYVDSVKGRFTISRDNKKSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAK GEILPLYFDY
WGQGT LTVSSAAA HHHHHH

SEQ ID No. 410 1.2.2 (clon 1.2 con extensión C-terminal y etiqueta His)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGS
VQYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQGT
LTVSSAAA HHHHHH

SEQ ID No. 411 1.2.3 (clon 1.2 con extensión C-terminal)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGS
VQYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQGT
LTVSSA

SEQ ID No. 412 1.3.2 (clon 1.3 con extensión C-terminal y etiqueta His)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGS
VQYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQGT
LTVSS AAA HHHHHH

SEQ ID No.413 1.3.3 (clon 1.3 con extensión C-terminal)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGS
VQYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQGT
LTVSSA

SEQ ID No. 414 1.6.1 (clon 1.6 expresado a partir de vector de fagémido: con residuos ligadores y etiqueta His)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGS
EQYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQGT
LVTVSSLEGGGS HHHHHH

SEQ ID No. 415 1.7.1 (clon 1.7 expresado a partir de vector de fagémido: con residuos ligadores y etiqueta His)

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQAPGKGLEWVAKIEQDG
SEYYVDSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQG
TLVTVSS LEGGGS HHHHHH

SEQ ID No. 416 1.10.1 (clon 1.10 expresado a partir de vector de fagémido: con residuos ligadores y etiqueta His)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYRMYWVRQAPGKGLEWVASIEQDG
SEYYVDSVKGRFTISRDNAKKSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQG
TLVTVSS LEGGGS HHHHHH

SEQ ID No.417 1.3.1 (clon 1.3 expresado a partir de vector de fagémido: con residuos ligadores y etiqueta His)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGS
VQYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQGT
LVTVSS LEGGGS HHHHHH

SEQ ID No. 418 3.2.1 (clon 3.2 expresado a partir de vector de fagémido: con residuos ligadores y etiqueta His)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYNADAYYNWVRQAPGQGLEWMGSIKPNP
GATKYAQKFQGRVTITRDTISITAYMELSRLSDDTAVYYCASLDRDTWYPHSYAGW
FDAWGQGTTLVTVSS LEGGGS HHHHHH

SEQ ID No. 419 1.1.1 (clon 1.1 expresado a partir de vector de fagémido: con residuos ligadores y etiqueta His)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVANIKQDG
SEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLHFDYWGQG
TLVTVSS LEGGGS HHHHHH

SEQ ID No. 420 1.16.1 (clon 1.16 expresado a partir de vector de fagémido: con residuos ligadores y etiqueta His)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGS
EQYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQGT
LVTVSS LEGGGS HHHHHH

SEQ ID No. 421 1.20.1 (clon 1.20 expresado a partir de vector de fagémido: con residuos ligadores y etiqueta His)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMWVRQAPGKGLEWVAKIEQDG
SEYYADSVKGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQG
TLVTVSS LEGGGS HHHHHH

SEQ ID No. 422 1.19.1 (clon 1.19 expresado a partir de vector de fagémido: con residuos ligadores y etiqueta His)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSSYGMWVRQAPGKGLEWVAEIKQDG
SEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQG
TLVTVSS LEGGGS HHHHHH

SEQ ID No. 423 1.17.1 (clon 1.17 expresado a partir de vector de fagémido: con residuos ligadores y etiqueta His)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKPTGS
VQYYVSDVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQGT
LTVVSS LEGGGS HHHHHH

SEQ ID No. 424 1.18.1 (clon 1.18 expresado a partir de vector de fagémido: con residuos ligadores y etiqueta His)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGS
VQYYVGGVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQGT
LTVVSSLEGGS HHHHHH

SEQ ID No. 425 1.21.1 (clon 1.21 expresado a partir de vector de fagémido: con residuos ligadores y etiqueta His)

EVQLVESGGGLVLPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGS
EQYYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQGT
LTVVSS LEGGGS HHHHHH

Bivalentes: 1.10-3(G₄S)-1.1(E1/6Q)

SEQ ID No. 430

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYRMYWVRQAPGKGLEWVASIEQDG
SEYYVDSVKGRFTISRDNANKSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQG
TLTVSSGGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYS
MYWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNANKSLFLQMNSLRAE
DTAVYYCAKGEILPLHFDYWGQGT LTVVSS

SEQ ID No.431

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCT
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGTTATCGCATGTACTGG
GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAGCATAGAACAAGA
TGGAAGTGAGGAATACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGA
GACAACGCCAAGAAGTCACTGTTTCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCCGAGGACA
CGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATACTACCCCTCTACTTTGACTACTG
GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGAGGTAGTGGTGGAG
GAGGTAGTGGTGGAGGAGGTAGTCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGC
TTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCT
TTAGTAGTTATTTCATGTACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGT
GGGTGGCCAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTGTGAA
GGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTTTCTGCAAATG
AATAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGAAATA
CTACCCCTCCACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCA

Biparatópicas: 3.2-2(G₄S)-1.2

SEQ ID No. 432

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYNADAYYINWVRQAPGQGLEWMGSIKPN
GATKYAQKFQGRVTITRDTSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCASLDRDTWYPHSYAGW
FDAWGQGT LTVVSSAAGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF

SSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGSVQYYVSDVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID No.433

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTAAAGAAGCCTGGGGCCTCGGTG
AAGGTCTCCTGTAAGGCTTCCGGATATAACGCGGACGCCTATTATATAAATTGGGT
GCGACAGGCCCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGATGGGAAGTATCAAGCCTAATAC
CGGTGCCACAAAATATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGAGTCACCATAACCAGGGAC
ACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACG
GCCGTGTATTACTGTGCGAGTCTGGATCGGGATACGTGGTACCCGCACTCCTACG
CGGGGTGGTTCGACGCGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCAGCG
GCCGGTGGTGGCGGTTTCAGGTGGAGGTGGTAGTGAGGTTCAGTTGGTGGAAAGC
GGCGGTGGCCTGGTCCAGCCGGGTGGTAGCCTGCGCCTGTCCTGCGCGGCTAG
CGGTTTCACGTTTAGCAGCTACAGCATGTACTGGGTGCGTCAAGCGCCAGGCAAA
GGTCTGGAATGGGTGCGGAGATTAAGCAAGACGGTTCGTTCAGTATTATGTCA
GCGACGTGAAGGGTCGTTTTACCATCAGCCGTGACAACGCGAAAAACAGCCTGTA
TTTGCAGATGAATCCCTGCGCGCTGAAGATACCGCGGTGTATTACTGTGCGAAA
GGTGAGATTCTGCCGCTGTACTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTACTG
5 TCTCGAGC

Biparatópicas 3.2-4(G+S)-1.2

SEQ ID No. 434

10 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYNADAYYINWVRQAPGQGLEWMGSIKPN
GATKYAQKFQGRVTITRDTISISTAYMELSLRLSDDTAVYYCASLDRDTWYPHSYAGW
FDWVGQGLTVTVSSAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL
RLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGSVQYYVSDVKGRFTISRDN
AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID No. 435

15 CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTAAAGAAGCCTGGGGCCTCGGTG
AAGGTCTCCTGTAAGGCTTCCGGATATAACGCGGACGCCTATTATATAAATTGGGT
GCGACAGGCCCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGATGGGAAGTATCAAGCCTAATAC
CGGTGCCACAAAATATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGAGTCACCATAACCAGGGAC
ACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACG
GCCGTGTATTACTGTGCGAGTCTGGATCGGGATACGTGGTACCCGCACTCCTACG
CGGGGTGGTTCGACGCGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCAGCG
GCCGGTGGTGGCGGTTTCAGGAGGTGGAGGTTCAGGAGGTGGTGGTCTGGTGG
AGGTGGTAGTGAGGTTTCAGTTGGTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTCCAGCCGG
GTGGTAGCCTGCGCCTGTCCTGCGCGGCTAGCGGTTTCACGTTTAGCAGCTACA

GCATGTA CTGGGTGCGTCAAGCGCCAGGCCAAAGGTCTGGAATGGGTTGCCGAGA
TTAAGCAAGACGGTTCTGTTCAGTATTATGTCAGCGACGTGAAGGGTCGTTTTACC
ATCAGCCGTGACAACGCGAAAAACAGCCTGTATTTGCAGATGAATTCCTGCGCG
CTGAAGATACCGCGGTGTATTACTGTGCGAAAGGTGAGATTCTGCCGCTGTACTT
CGATTACTGGGGCCAAGGCACCCTGGTACTGTCTCGAGC

Biparatópicas 3.2-6(G₄S)-1.2

5 SEQ ID No. 436

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYNADAYYINWVRQAPGQGLEWMGSIKNT
GATKYAQKFQGRVTITRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCASLDRDTWYPHSYAGW
FDAW/QQGLTVTVSSAAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVES
GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMYWVRQAPGKGLEWVAEIKQDGSVQYYVS
DVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGEILPLYFDYWQQGLTVTVSS

SEQ ID No. 437

10

CAGGTTCACTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTAAAGAAGCCTGGGGCCTCGGTG
AAGGTCTCCTGTAAGGCTTCCGGATATAACGCGGACGCCTATTATATAAATTGGGT
GCGACAGGCCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGATGGGAAGTATCAAGCCTAATAC
CGGTGCCACAAAATATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGAGTCACCATAACCAGGGAC
ACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACG
GCCGTGTATTACTGTGCGAGTCTGGATCGGGATACGTGGTACCCGCACTCCTACG
CGGGGTGGTTCGACGCGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTTCAGCG
GCCGGTGGTGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGAGGTGGAGGTTCAAGGAGG
TGGTGGTCTGGCGGCGGTGGATCGGGTGGAGGTGGTAGTGAGGTTCAAGTTGGT
GGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTCCAGCCGGGTGGTAGCCTGCGCCTGTCTCGCG
CGGCTAGCGGTTTCACGTTTAGCAGCTACAGCATGTACTGGGTGCGTCAAGCGC
CAGGCCAAAGGTCTGGAATGGGTTGCCGAGATTAAGCAAGACGGTTCTGTTCAGTA
TTATGTCAGCGACGTGAAGGGTCGTTTTACCATCAGCCGTGACAACGCGAAAAAC
AGCCTGTATTTGCAGATGAATTCCTGCGCGCTGAAGATACCGCGGTGTATTACT
GTGCGAAAGGTGAGATTCTGCCGCTGTACTTCGATTACTGGGGCCAAGGCACCCT
GGTACTGTCTCGAGC

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un anticuerpo de dominio variable de cadena pesada único de inmunoglobulina capaz de unirse a IL-17A humana, que comprende un dominio de inmunoglobulina variable de cadena pesada humana (V_H) que comprende una secuencia de CDR1 que comprende SEQ ID NO. 5, una secuencia de CDR2 que comprende SEQ ID NO. 6 y una secuencia de CDR3 que comprende SEQ ID NO. 7, para su uso en el tratamiento de la psoriasis o la dermatitis atópica, administrándose el anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina tópicamente a piel enferma.
- 10 2.- El anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina para su uso según la reivindicación 1, comprendiendo o consistiendo dicho dominio V_H en SEQ ID NO. 8 o una secuencia con al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% de homología con SEQ ID NO. 8.
- 15 3.- El anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina para su uso según la reivindicación 2, que comprende una extensión C-terminal de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 residuos de aminoácido.
- 4.- El anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina para su uso según la reivindicación 3, siendo dicha extensión C-terminal un residuo de alanina único.
- 20 5.- El anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina para su uso según una reivindicación anterior, obteniéndose o pudiendo obtenerse el anticuerpo de dominio único de inmunoglobulina a partir de un ratón que no produce ninguna cadena ligera o pesada endógena funcional.
- 25 6.- El anticuerpo de dominio de cadena pesada único de inmunoglobulina para su uso según las reivindicaciones 1-5, administrándose el anticuerpo como composición farmacéutica.
- 7.- El anticuerpo de dominio de cadena pesada único de inmunoglobulina para su uso según las reivindicaciones 1-6, codificándose el anticuerpo mediante una molécula de ácido nucleico aislada que comprende SEQ ID NO:350.

Figura 1

[illegible]

Figura 1 continuación

1.39 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMY WVRQAPGKGLEWVA NIKQDSEYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLYFDY WQGGTLVTSS
1.40 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMY WVRQAPGKGLEWVA NIEQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLHFDY WQGGTLVTSS
1.41 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMY WVRQAPGKGLEWVA NIEQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLHFDY WQGGTLVTSS
1.42 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMY WVRQAPGKGLEWVA NIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLHFDY WQGGTLVTSS
1.43 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMY WVRQAPGKGLEWVA NIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLHFDY WQGGTLVTSS
1.44 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMY WVRQAPGKGLEWVA NIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLHFDY WQGGTLVTSS
1.45 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMY WVRQAPGKGLEWVA NIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLHFDY WQGGTLVTSS
1.46 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMY WVRQAPGKGLEWVA NIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLHFDY WQGGTLVTSS
1.47 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMY WVRQAPGKGLEWVA NIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLHFDY WQGGTLVTSS
1.48 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMY WVRQAPGKGLEWVA NIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLHFDY WQGGTLVTSS
1.49 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYQMY WVRQAPGKGLEWVA EIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLVFDH WQGGTLVTSS
1.50 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYSMI WVRQAPGKGLEWVA DIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEVLPDYFDY WQGGTLVTSS
1.51 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYSMI WVRQAPGKGLEWVA DIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEVLPDYFDY WQGGTLVTSS
1.52 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYNNY WVRQAPGKGLEWVA EIDQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLHFDY WQGGTLVTSS
1.53 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYRMV WVRQAPGKGLEWVA SIEQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLHFDY WQGGTLVTSS
1.54 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYQMY WVRQAPGKGLEWVA GIEQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLVFDH WQGGTLVTSS
1.55 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYEMY WVRQAPGKGLEWVA NIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLHFDY WQGGTLVTSS
1.56 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYSMY WVRQAPGKGLEWVA NIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLHFDY WQGGTLVTSS
1.57 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYRMV WVRQAPGKGLEWVA SINQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLHFDY WQGGTLVTSS
1.58 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYNNY WVRQAPGKGLEWVA SINQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLHFDY WQGGTLVTSS
1.59 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYNNY WVRQAPGKGLEWVA KIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPHYFDY WQGGTLVTSS
1.60 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYSMY WVRQAPGKGLEWVA NIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLVFDH WQGGTLVTSS
1.61 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYSMY WVRQAPGKGLEWVA NIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLVFDH WQGGTLVTSS
1.62 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYSMY WVRQAPGKGLEWVA NIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLVFDH WQGGTLVTSS
1.63 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMY WVRQAPGKGLEWVA KIEQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLYFDY WQGGTLVTSS
1.64 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMY WVRQAPGKGLEWVA KIEQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLYFDY WQGGTLVTSS
1.65 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYQMY WVRQAPGKGLEWVA GIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLVFDH WQGGTLVTSS
1.66 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMY WVRQAPGKGLEWVA EIKQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLYFDY WQGGTLVTSS
1.67 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYSMY WVRQAPGKGLEWVA GIEQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLYFDY WQGGTLVTSS
1.68 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYRMV WVRQAPGKGLEWVA EIEQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLYFDY WQGGTLVTSS
1.69 EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMY WVRQAPGKGLEWVA EIQDSEKYYVDSVKG RETISRDNAKMSLYIQMNSIRAEDTAVYYCAK GEILPLYFDY WQGGTLVTSS

Figura 2

Clon	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
2.1	QVQLVQSGEGLVQPQGGSLRLSCAASGTFE	SYGMG	WRQAPGQGLEWVA	KIKQDGESEKDYVDYVSKG	RPTISRDAKAKSLFLQMSLRRAEDTAVYYCAR	ESIFGIPED	WQGGTLVTVSS
2.2	EVQLVESGGGVVQSGSLRLSCAASGTFE	AYWNG	WRQAPGQGLEWVA	KIKQDGESEKDYVDYVSKG	RPTISRDAKAKSLFLQMSLRRAEDTAVYYCAR	ESIFGIPED	WQGGTLVTVSS
2.3	QVQLVQSGEGLVQPQGGSLRLSCITSCSTFE	AYWNG	WRQAPGQGLEWVA	KIKQDGESEKDYVDYVSKG	RPTISRDAKAKSLFLQMSLRRAEDTAVYYCAR	ESIFGIPED	WQGGTLVTVSS
2.4	QVQLVQSGEGLVQPQGGSLRLSCAASGTFE	SYWMS	WRQAPGQGLEWVA	KIKQDGESEKDYVDYVSKG	RPTISRDAKAKSLFLQMSLRRAEDTAVYYCAR	ESIFGIPED	WQGGTLVTVSS
2.5	QVQLVQSGEGLVQPQGGSLRLSCAASGTFE	GYWNG	WRQAPGQGLEWVA	KIKQDGESEKDYVDYVSKG	RPTISRDAKAKSLFLQMSLRRAEDTAVYYCAR	ESIFGIPED	WQGGTLVTVSS
2.6	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTFE	AYWNG	WRQAPGQGLEWVA	KIKQDGESEKDYVDYVSKG	RPTISRDAKAKSLFLQMSLRRAEDTAVYYCAR	ESIFGIPED	WQGGTLVTVSS
2.7	EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGTFE	SYWMS	WRQAPGQGLEWVA	KIKQDGESEKDYVDYVSKG	RPTISRDAKAKSLFLQMSLRRAEDTAVYYCAR	ESIFGIPED	WQGGTLVTVSS
2.8	EVQLVQSGEGLVQPQGGSLRLSCAASGTFE	GYWNG	WRQAPGQGLEWVA	KIKQDGESEKDYVDYVSKG	RPTISRDAKAKSLFLQMSLRRAEDTAVYYCAR	ESIFGIPED	WQGGTLVTVSS
2.9	EVQLVQSGEGLVQPQGGSLRLSCAASGTFE	AYWNG	WRQAPGQGLEWVA	KIKQDGESEKDYVDYVSKG	RPTISRDAKAKSLFLQMSLRRAEDTAVYYCAR	ESIFGIPED	WQGGTLVTVSS

Figura 3

Clon	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
3.1	QVQLVQSGAEVKKPKASVSVSCAASGTFE	GYTMH	WRQAPGQGLEWMA	WINPNSGCTNYAQTQ	RVTITRDTISISTAYWELSKLRSDTAVYYCAS	MDRDYDTSYGFQWFDS	WQGGTLVTVSS
3.2	QVQLVQSGAEVKKPKASVSVSCAASGTFE	AYYIN	WRQAPGQGLEWMA	SIKPNTGATKYAQTQ	RVTITRDTISISTAYWELSKLRSDTAVYYCAS	LDKDTWYPHSYAGWFDA	WQGGTLVTVSS
3.3	QVQLVQSGAEVKKPKASVSVSCAASGTFE	DYYLH	WRQAPGQGLEWMA	WINPNTGCTTKYAREFEG	RVTITRDTISISTAYWELSKLRSDTAVYYCAS	MDRDYDTSYGFQWFDS	WQGGTLVTVSS
3.4	QVQLVQSGAEVKKPKASVSVSCAASGTFE	DYYLH	WRQAPGQGLEWMA	WINPNTGCTTKYAREFEG	RVTITRDTISISTAYWELSKLRSDTAVYYCAS	MDRDWRSPNDYFGWFDS	WQGGTLVTVSS
3.5	QVQLVQSGAEVKKPKASVSVSCAASGTFE	DYYLH	WRQAPGQGLEWMA	WINPNTGCTTKYAREFEG	RVTITRDTISISTAYWELSKLRSDTAVYYCAS	LDKDRWSPNDYFGWFDS	WQGGTLVTVSS
3.6	QVQLVQSGAEVKKPKASVSVSCAASGTFE	DYYLH	WRQAPGQGLEWMA	WINPNTGCTTKYAREFEG	RVTITRDTISISTAYWELSKLRSDTAVYYCAS	LDKDRWSPNDYFGWFDS	WQGGTLVTVSS
3.7	QVQLVQSGAEVKKPKASVSVSCAASGTFE	DYYLH	WRQAPGQGLEWMA	WINPNTGCTTKYAREFEG	RVTITRDTISISTAYWELSKLRSDTAVYYCAS	LDKDRWSPNDYFGWFDS	WQGGTLVTVSS
3.8	QVQLVQSGAEVKKPKASVSVSCAASGTFE	DYYLH	WRQAPGQGLEWMA	WINPNTGCTTKYAREFEG	RVTITRDTISISTAYWELSKLRSDTAVYYCAS	LDKDRWSPNDYFGWFDS	WQGGTLVTVSS
3.9	QVQLVQSGAEVKKPKASVSVSCAASGTFE	AYHIN	WRQAPGQGLEWMA	SIKPNSGATKYAQTQ	RVTITRDTISISTAYWELSKLRSDTAVYYCAS	MDRDYDTSYGFQWFDS	WQGGTLVTVSS
3.10	QVQLVQSGAEVKKPKASVSVSCAASGTFE	AYHIN	WRQAPGQGLEWMA	SIKPNSGATKYAQTQ	RVTITRDTISISTAYWELSKLRSDTAVYYCAS	MDRDYDTSYGFQWFDS	WQGGTLVTVSS
3.11	QVQLVQSGAEVKKPKASVSVSCAASGTFE	AYHIN	WRQAPGQGLEWMA	SIKPNSGATKYAQTQ	RVTITRDTISISTAYWELSKLRSDTAVYYCAS	MDRDYDTSYGFQWFDS	WQGGTLVTVSS
3.12	QVQLVQSGAEVKKPKASVSVSCAASGTFE	AYHIN	WRQAPGQGLEWMA	SIKPNSGATKYAQTQ	RVTITRDTISISTAYWELSKLRSDTAVYYCAS	MDRDYDTSYGFQWFDS	WQGGTLVTVSS
3.13	QVQLVQSGAEVKKPKASVSVSCAASGTFE	AYHIN	WRQAPGQGLEWMA	SIKPNSGATKYAQTQ	RVTITRDTISISTAYWELSKLRSDTAVYYCAS	MDRDYDTSYGFQWFDS	WQGGTLVTVSS
3.14	QVQLVQSGAEVKKPKASVSVSCAASGTFE	AYYIN	WRQAPGQGLEWMA	SIKPNSGATKYAQTQ	RVTITRDTISISTAYWELSKLRSDTAVYYCAS	LDKDTWYPHSYAGWFDS	WQGGTLVTVSS

Figura 4

Clon	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
4.1	QVQLVQSGEGLVQPQGGSLRLSCAASGTFE	SYWMS	WRQAPGQGLEWVA	TIKQDGESEKDYVDYVSKG	RPTISRDAKAKSLFLQMSLRRAEDTAVYYCAR	GDITFDGARDI	WQGGTLVTVSS

Figura 5

Clon	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
5.1	EVQLVQSGEGLVQPQGGSLRLSCAASGTFE	SYWMS	WRQAPGQGLEWVA	NIKQDGESEKDYVDYVSKG	RPTISRDAKAKSLFLQMSLRRAEDTAVYYCAR	QGMPEFDY	WQGGTLVTVSS

Figura 6

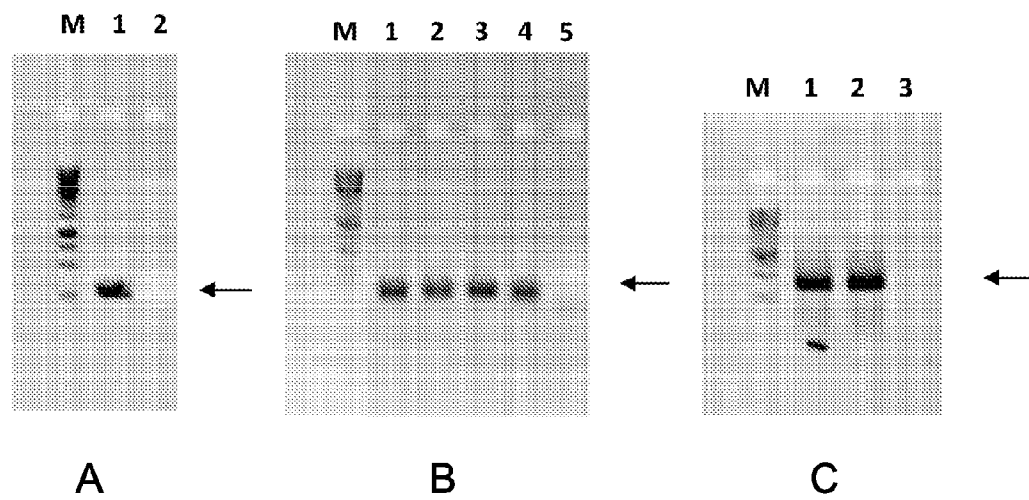


Figura 7

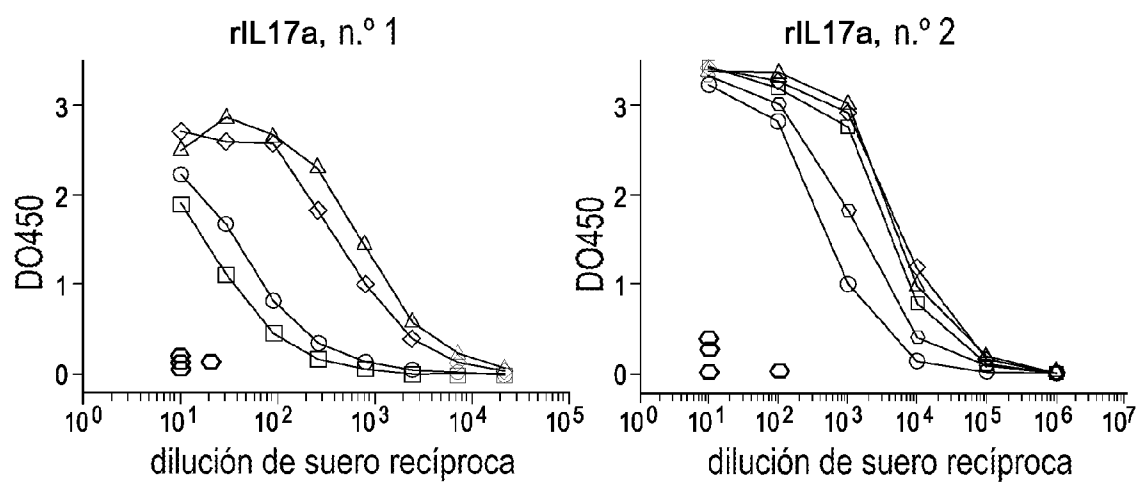


Figura 8

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,65	0,085	0,641	0,562	0,224	0,093	1,286	0,187	0,108	2,649	0,507	0,28
B	0,127	0,057	0,045	0,395	0,428	0,097	0,513	0,214	1,527	0,486	0,943	2,302
C	0,056	0,043	0,292	0,108	0,073	0,312	0,06	0,355	0,463	0,501	0,234	0,422
D	0,86	0,106	0,397	0,984	0,341	0,621	0,07	0,276	0,376	0,061	0,617	0,504
E	0,132	0,138	0,331	0,376	0,697	0,37	2,058	0,055	1,684	1,394	0,365	0,29
F	0,526	0,039	0,049	0,585	0,485	0,289	0,273	0,644	0,047	1,617	0,073	3,5
G	0,676	0,584	0,301	0,486	0,232	0,058	0,453	0,569	0,071	0,524	0,333	3,5
H	1,138	0,114	0,537	1,196	0,455	0,522	0,47	0,467	0,129	0,641	0,11	0,043

B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,037	0,036	0,039	0,571	0,04	0,037	0,041	0,039	0,043	0,041	0,039	0,047
B	0,042	0,042	0,043	0,043	0,043	0,043	0,045	0,045	0,067	0,045	0,049	0,049
C	0,046	0,038	0,093	0,038	0,037	0,037	0,039	0,038	0,038	0,038	0,038	0,037
D	0,039	0,039	0,039	0,042	0,04	0,04	0,045	0,039	0,04	0,039	0,039	0,04
E	0,04	0,04	0,04	0,041	0,044	0,041	0,041	0,041	0,043	0,041	0,042	0,042
F	0,048	0,049	0,046	0,04	0,038	0,054	0,038	0,035	0,037	0,041	0,042	0,051
G	0,059	0,037	0,029	0,039	0,034	0,033	0,032	0,034	0,027	0,028	0,03	0,027
H	0,955	0,043	0,04	0,043	0,041	0,039	0,039	0,039	0,044	0,04	0,04	0,045

Figura 9

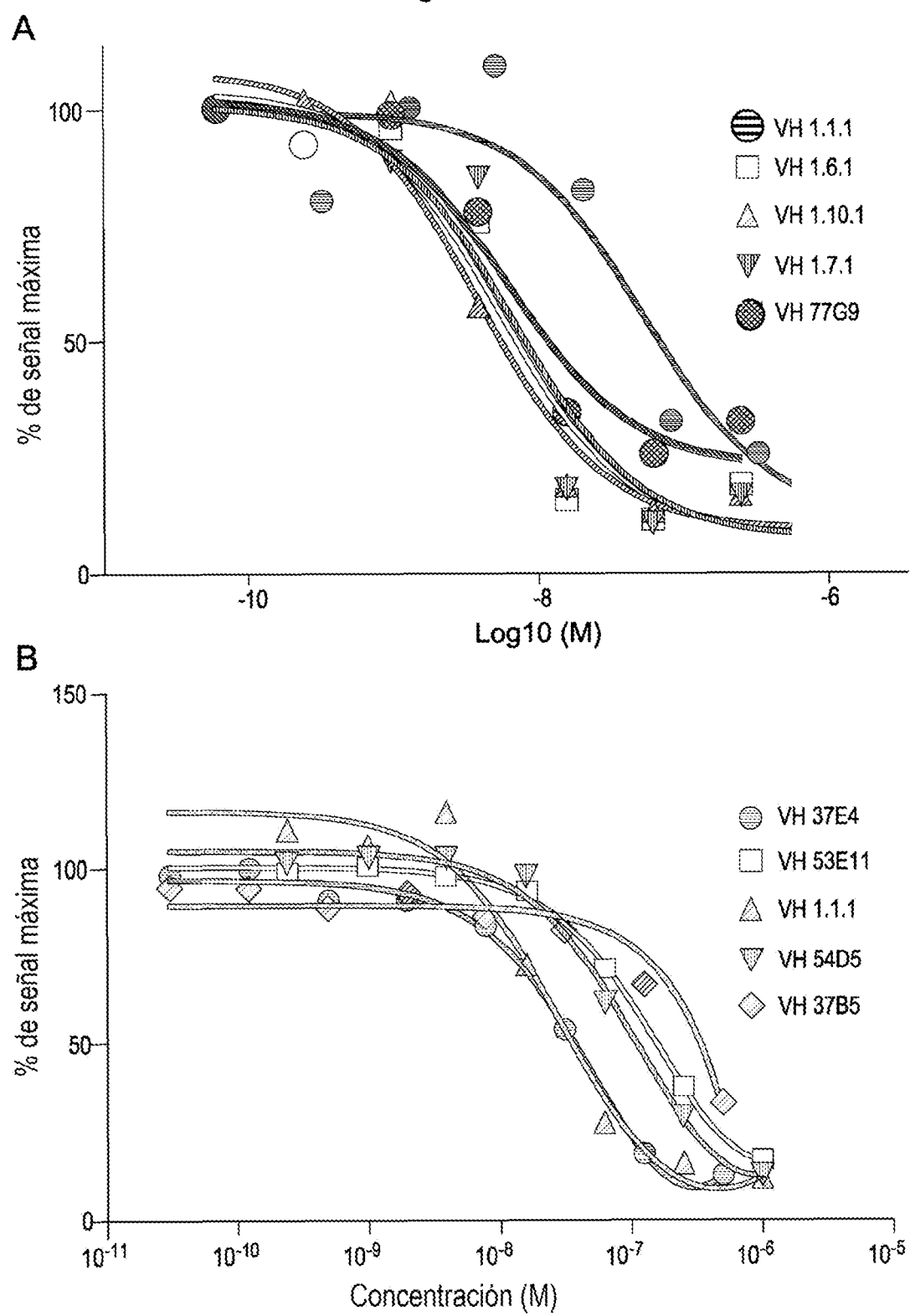


Figura 10

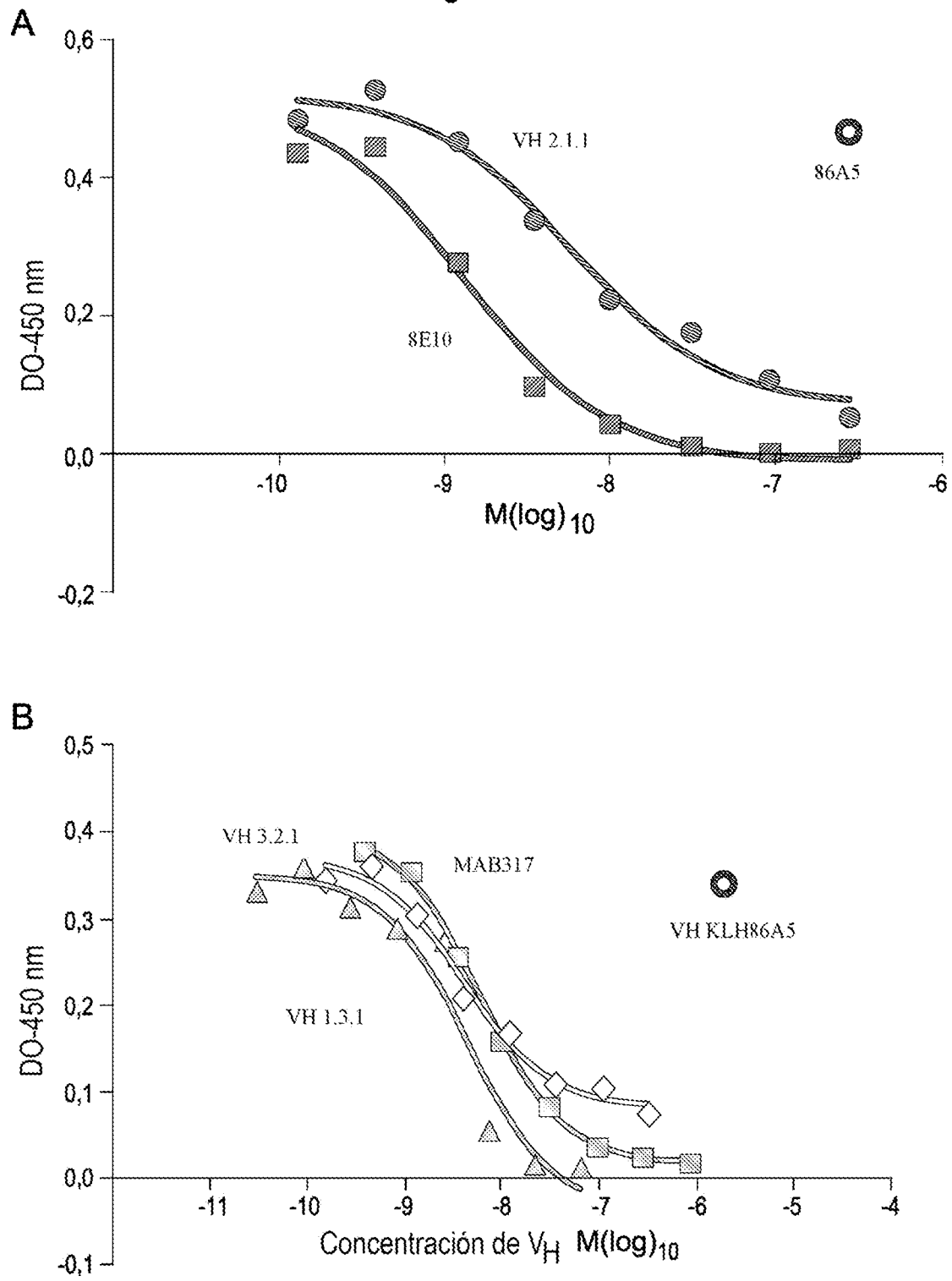
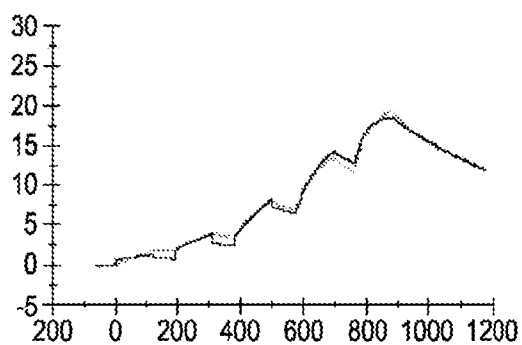


Figura 11

A



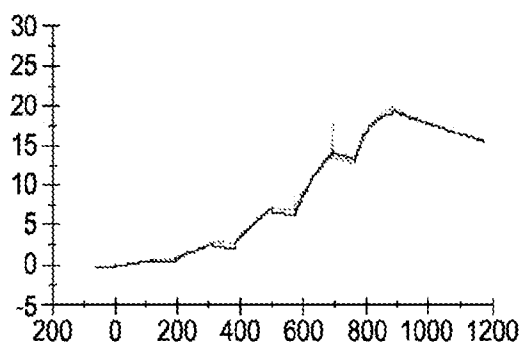
Ajuste: Unión 1.1

ka (1/Ms): 2,957E+5

kd (1/s): 0,001490

5 nM

B



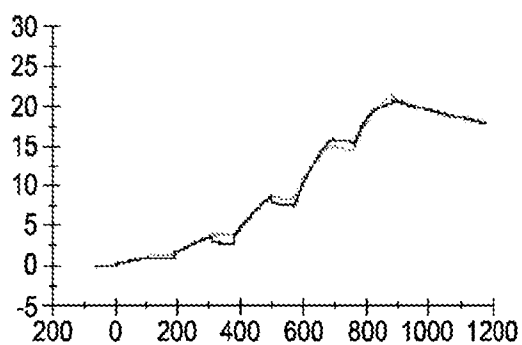
Ajuste: Unión 1.1

ka (1/Ms): 7,004E+5

kd (1/s): 7,548E-4

1 nM

C



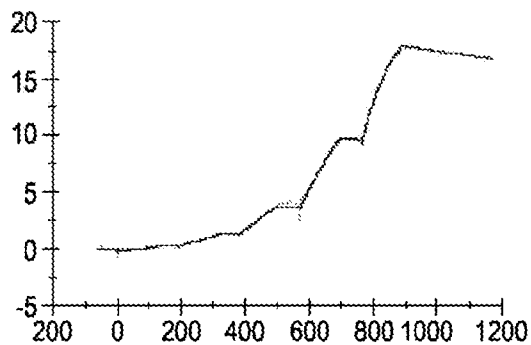
Ajuste: Unión 1.1

ka (1/Ms): 7,695E+5

kd (1/s): 4,824E-4

630 pM

D



Ajuste: Unión 1.1

ka (1/Ms): 9,640E+5

kd (1/s): 2,215E-4

230 nM

Figura 12

Clon 1.1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	SYSMYVWVRQAPGKGL	EWVANIKQD	QSEKYYVD	SVKG
37E4	..	..	..	..	..	..
53A9	..	..	..	..	..	..
35B6	..	..	..	..	..	..
60D10	..	..	..	..	..	..
53E11	Q	..	..	..	..	..
55B8	Q	..	..	..	..	..
60C5	..	..	..	..	..	..
60E6	..	..	..	..	..	..
54E3	..	..	..	..	..	..
54D5	..	..	..	..	..	..
55B9	..	..	..	..	..	..
59B1	..	..	..	..	..	..
59C2	Q	..	..	..	..	..
37D8	..	..	..	..	..	..
35G5	Q	..	..	..	..	..
37D8	..	..	..	..	..	..
35G11	Q	..	..	..	..	..
35D1	Q	..	..	..	..	..
35G3	..	..	..	..	..	..
35C12	Q	..	..	..	..	..

Figura 12
continuación

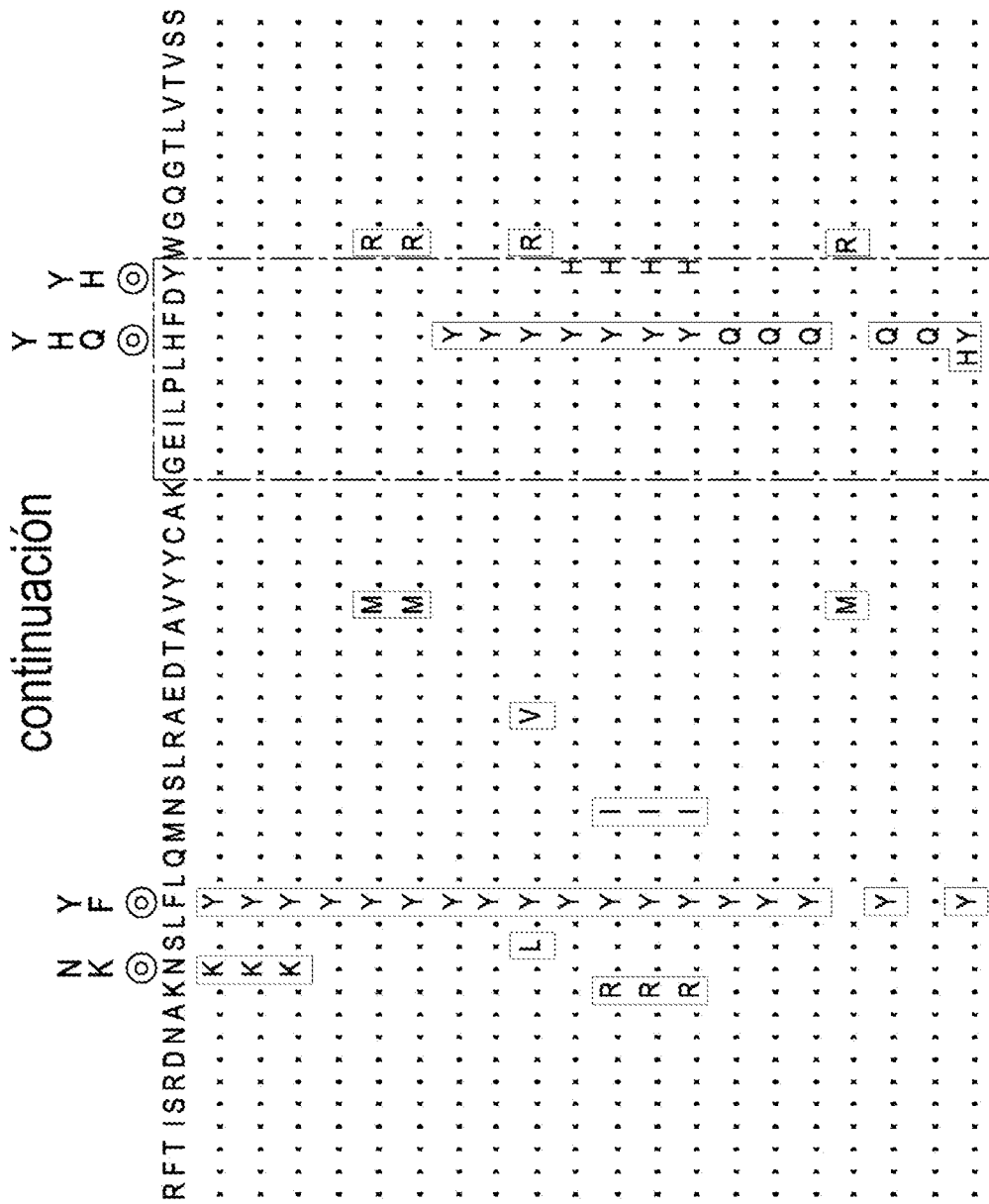
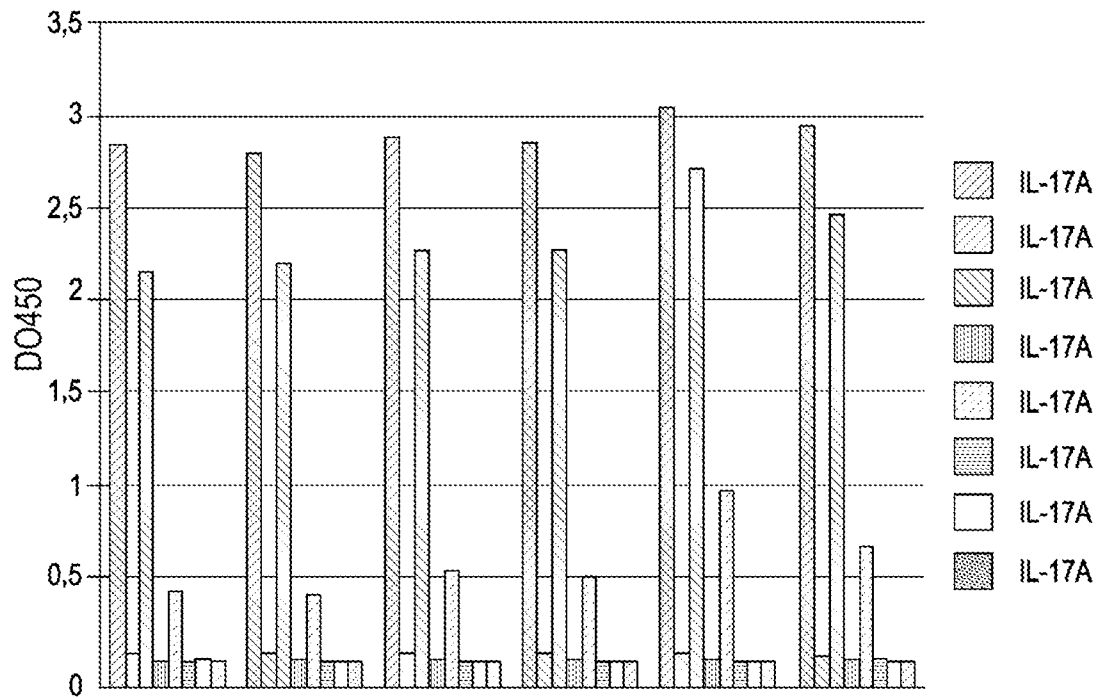


Figura 13

A



B

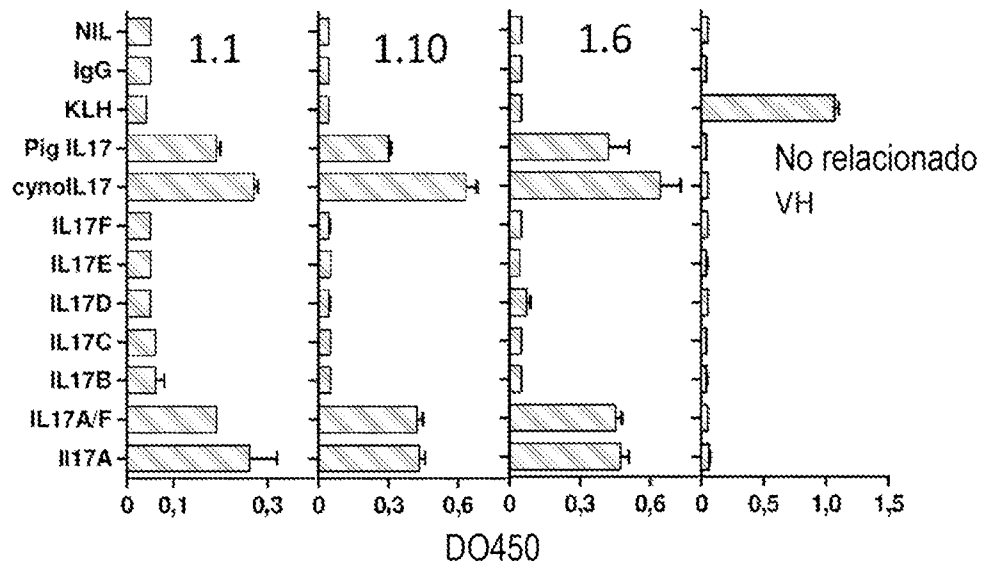


Figura 14

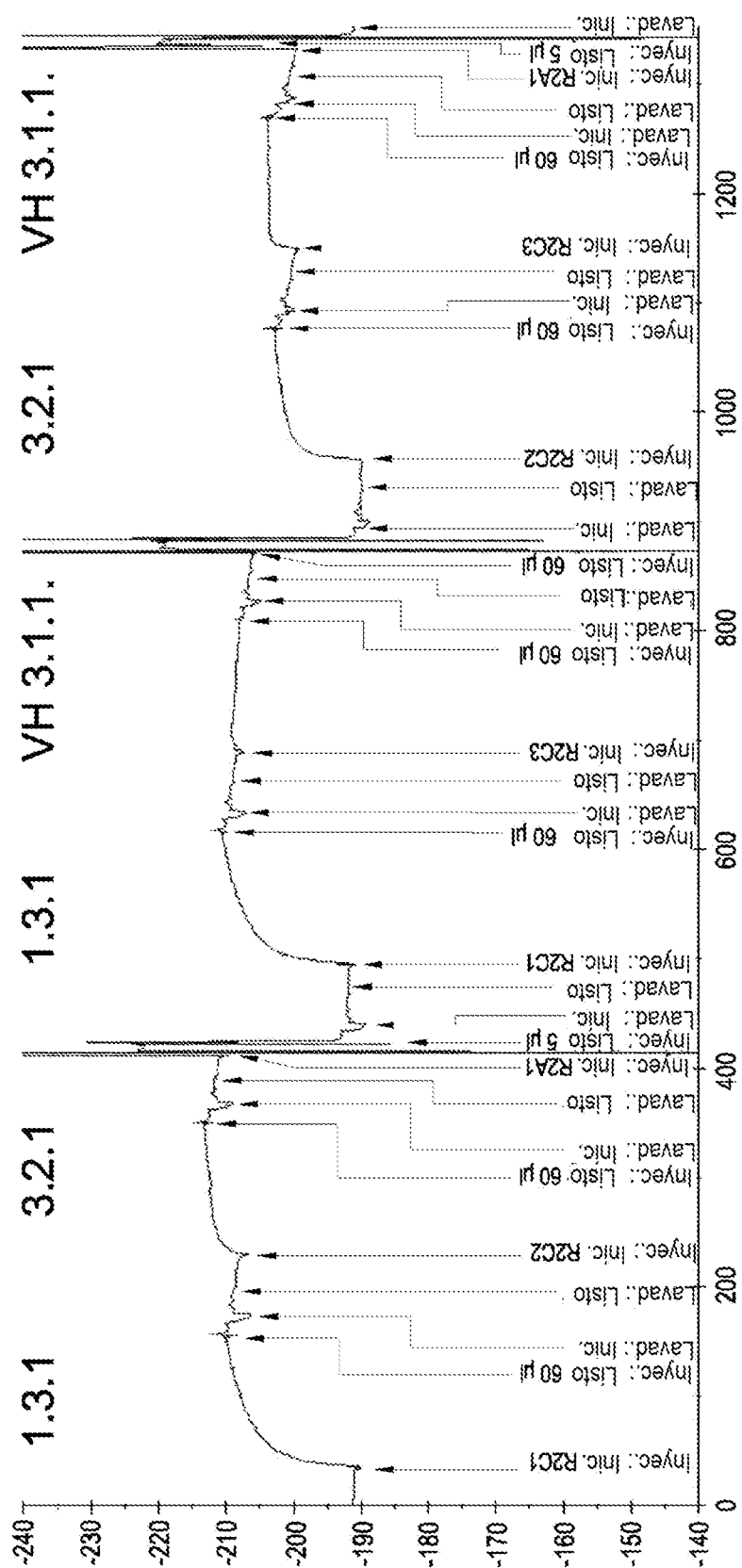
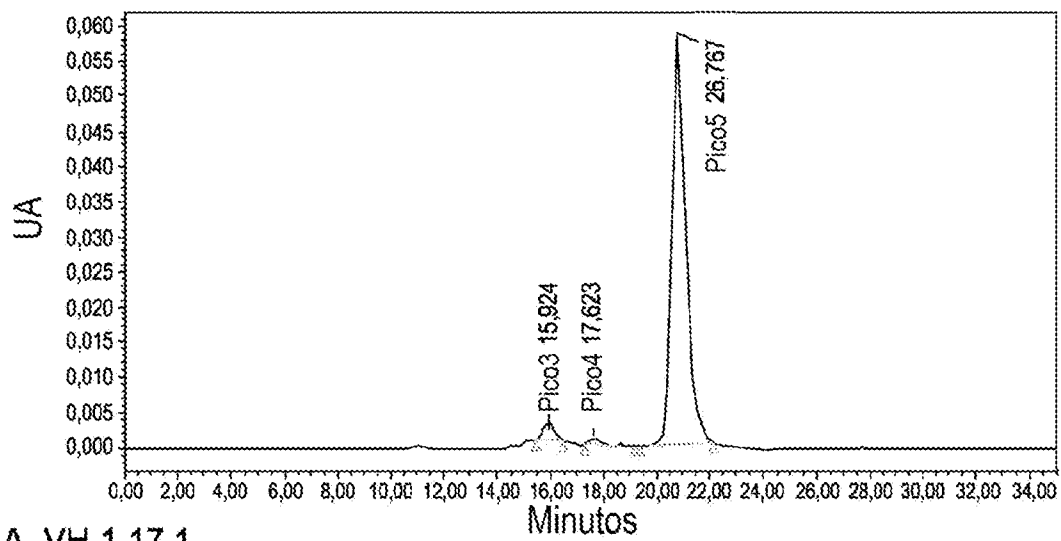
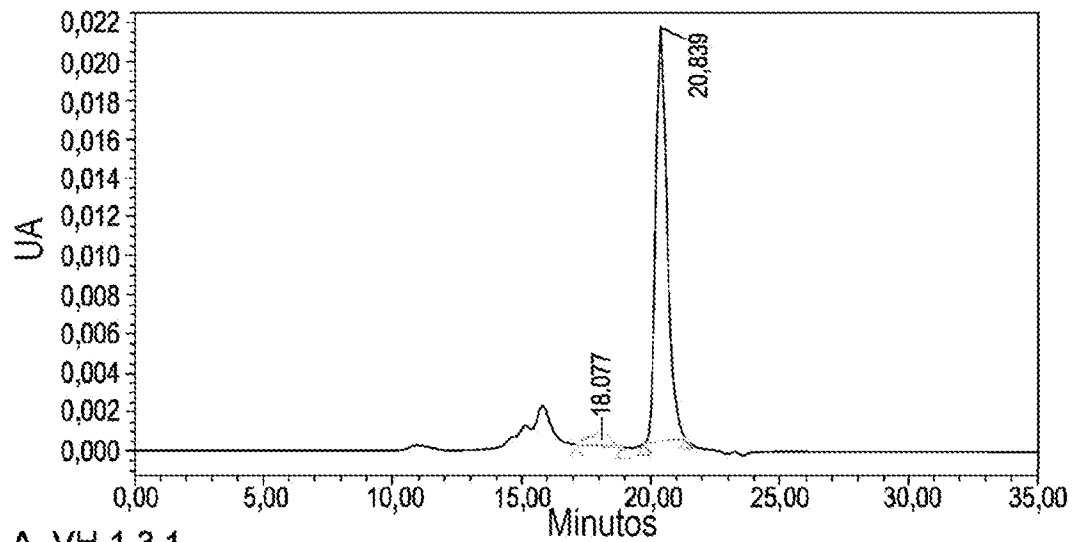


Figura 15

A. VH 1.10.1



A. VH 1.17.1



A. VH 1.3.1

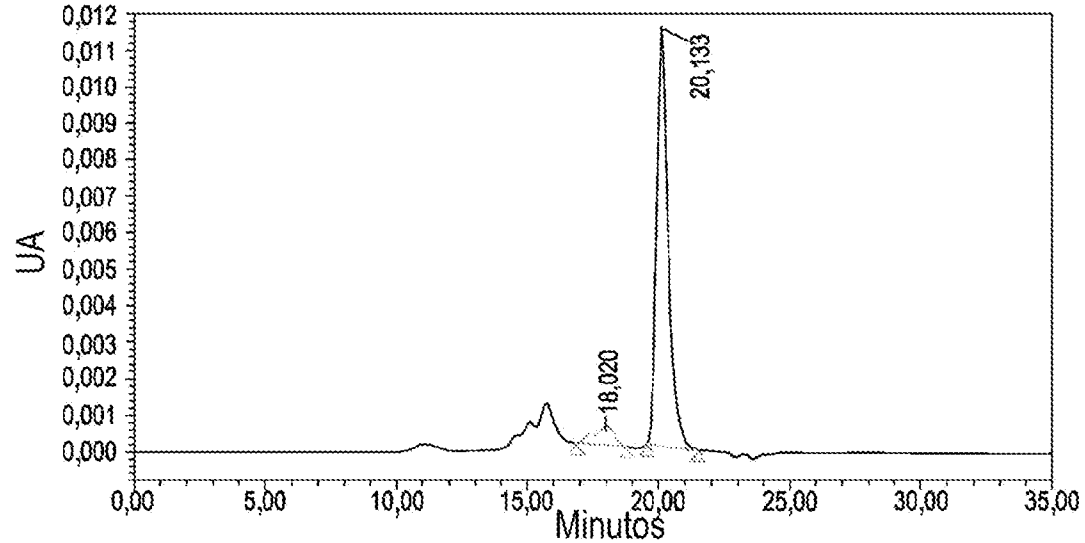


Figura 15 continuación

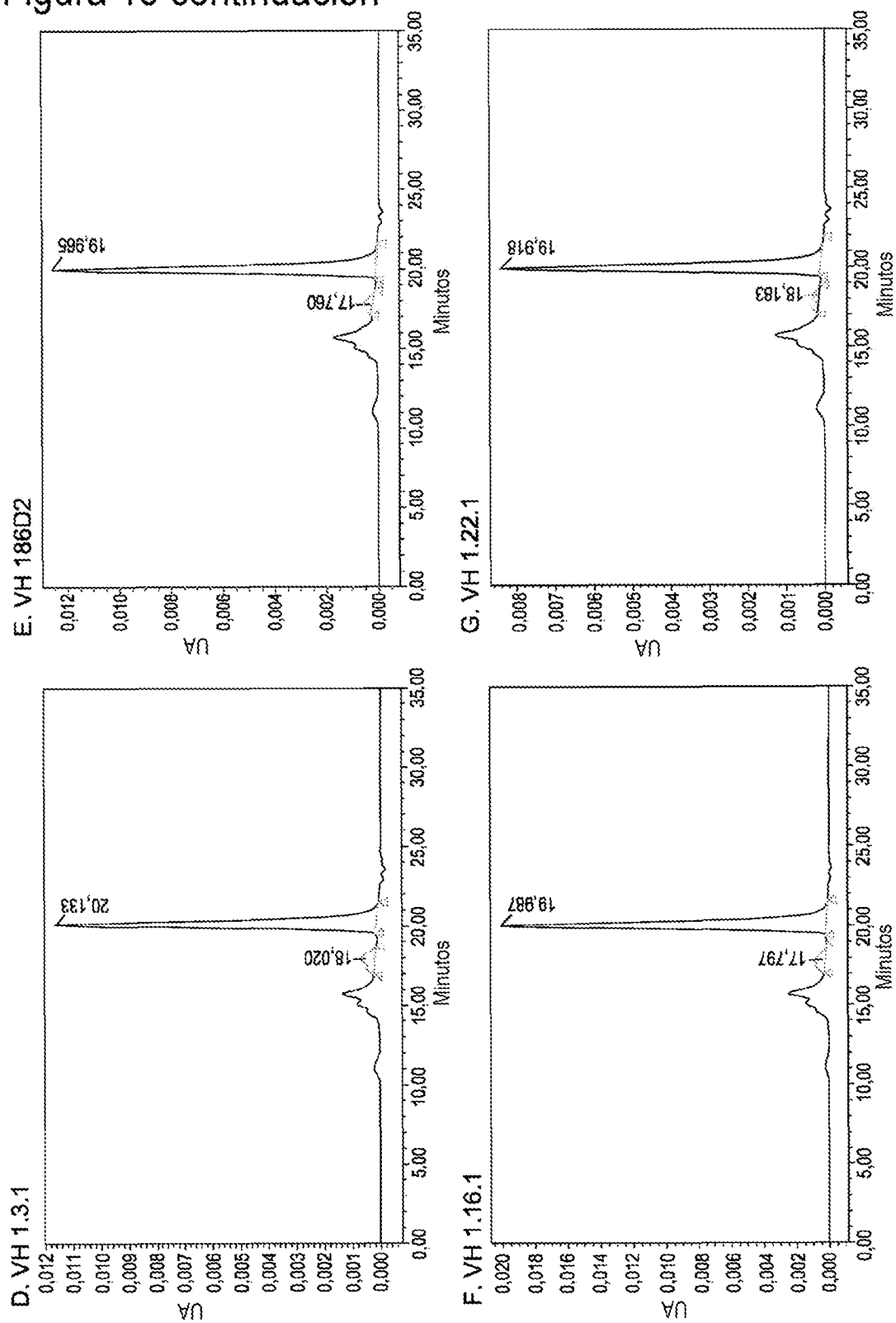


Figura 15 continuación

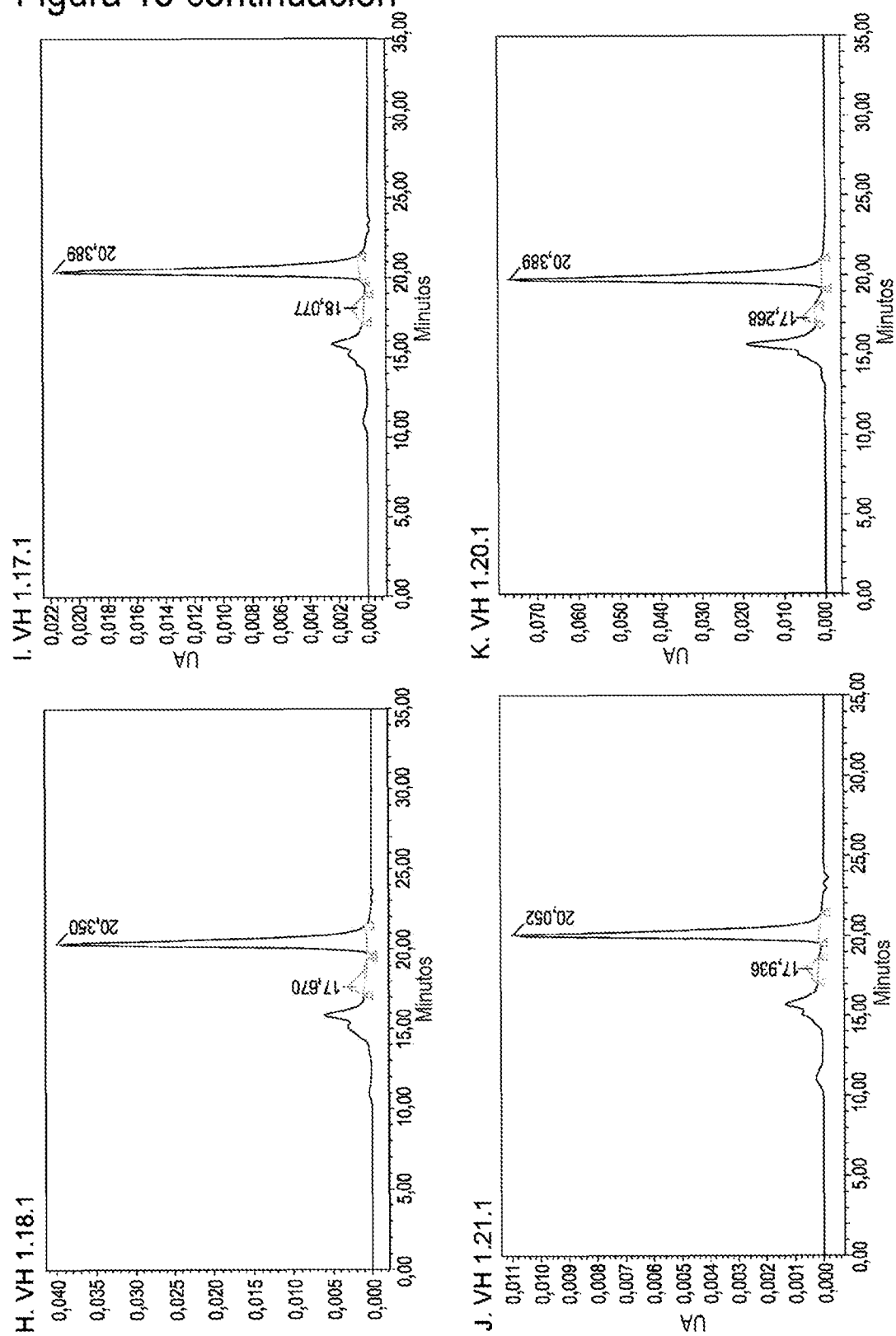
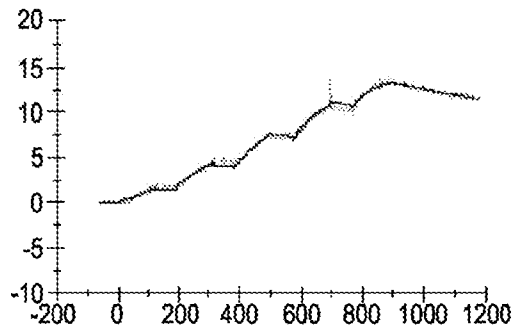


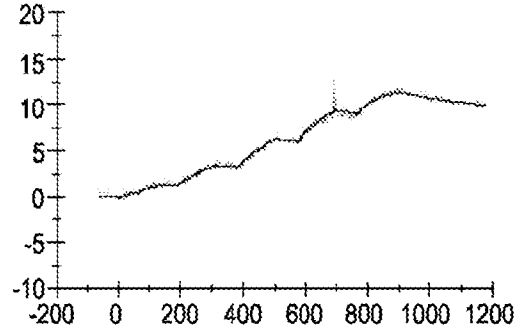
Figura 16

A. VH 1.3.2 (HIS) (630 pM)



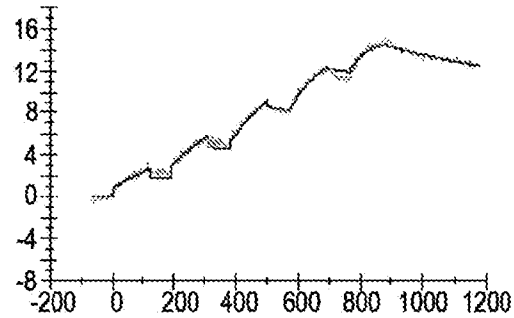
Ajuste: Unión 1.1
 k_a (1/Ms): 7,994E+5
 k_d (1/s): 5,012E-4

VH 1.3.3 No HIS (680 pM)



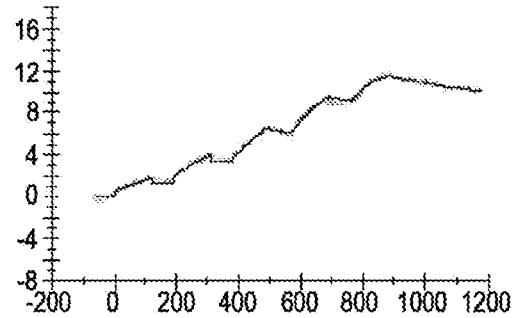
Ajuste: Unión 1.1
 k_a (1/Ms): 7,495E+5
 k_d (1/s): 5,090E-4

B. VH 1.2.2 (+HIS) (550 pM)



Ajuste: Unión 1.1
 k_a (1/Ms): 8,741E+5
 k_d (1/s): 4,852E-4

VH 1.2.3 No HIS (620 pM)



Ajuste: Unión 1.1
 k_a (1/Ms): 7,447E+5
 k_d (1/s): 4,646E-4

C

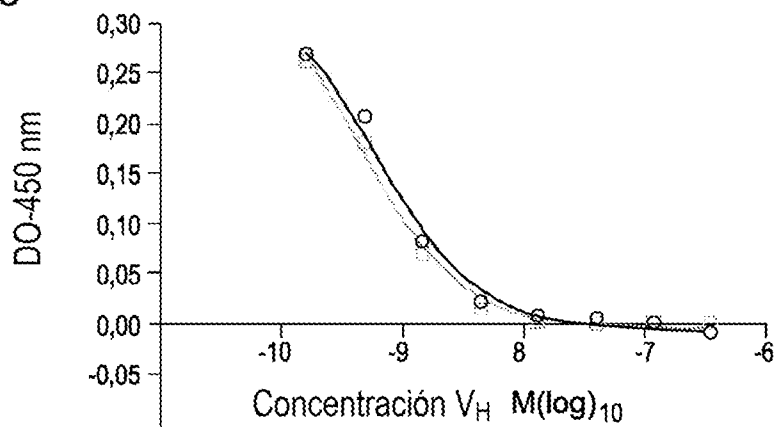


Figura 17

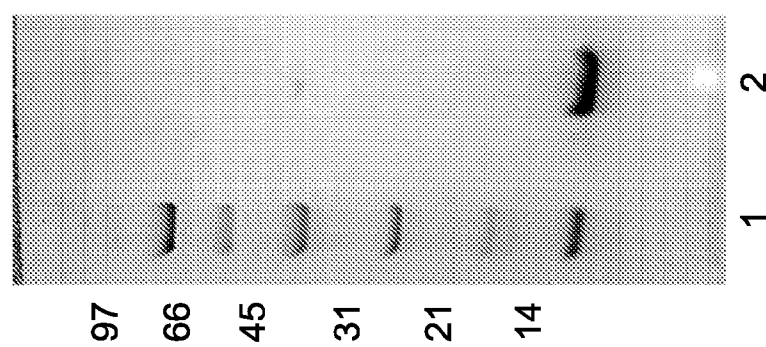
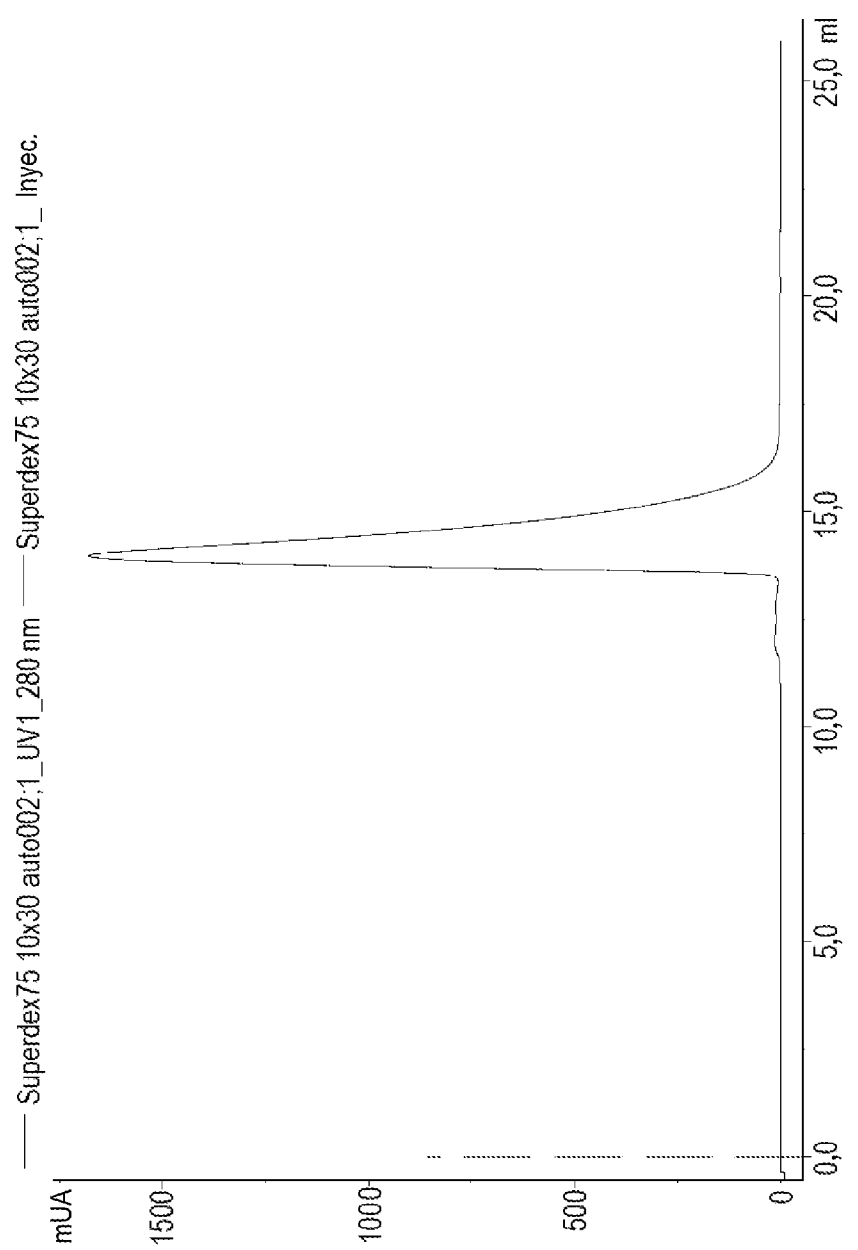
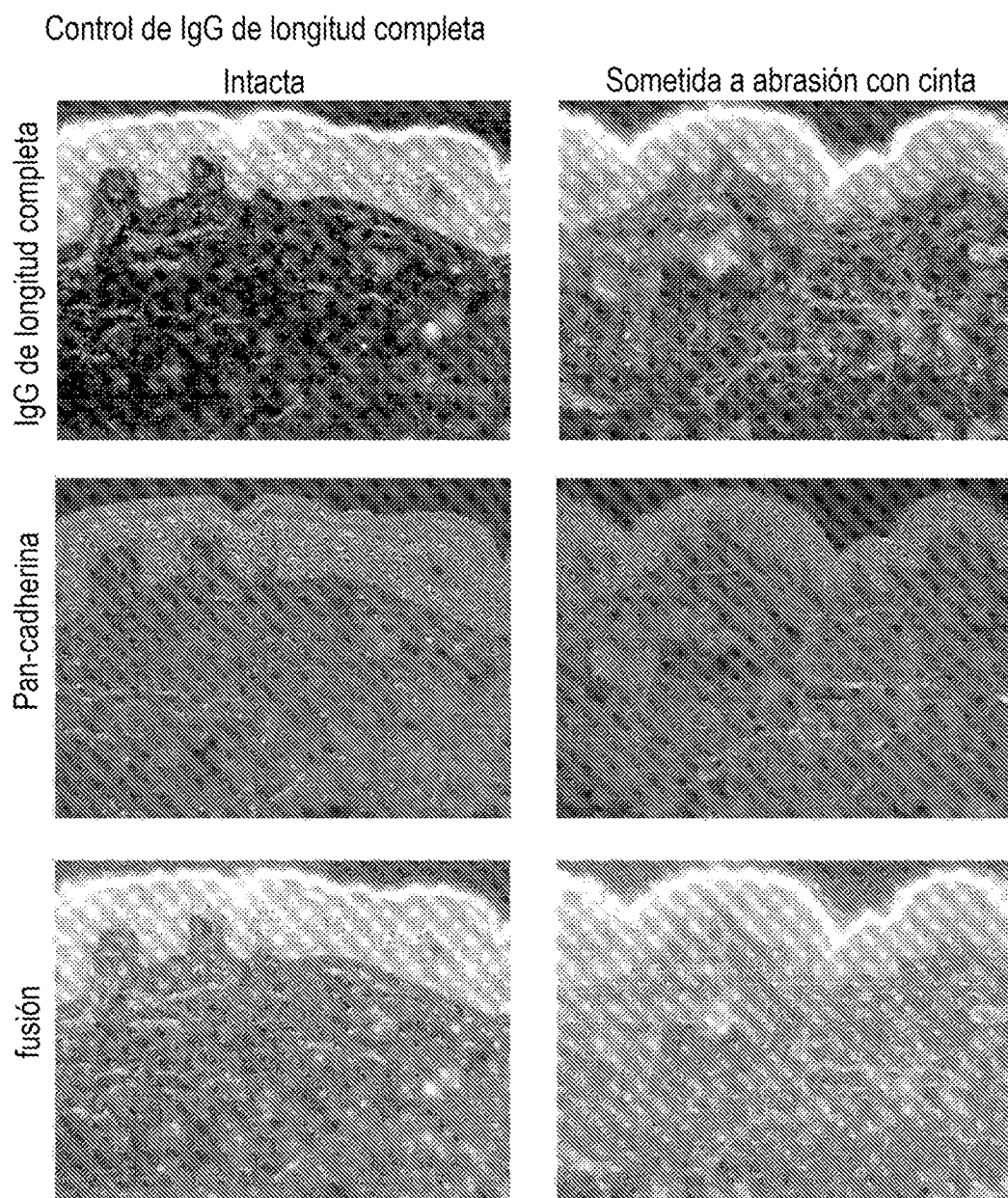


Figura 18



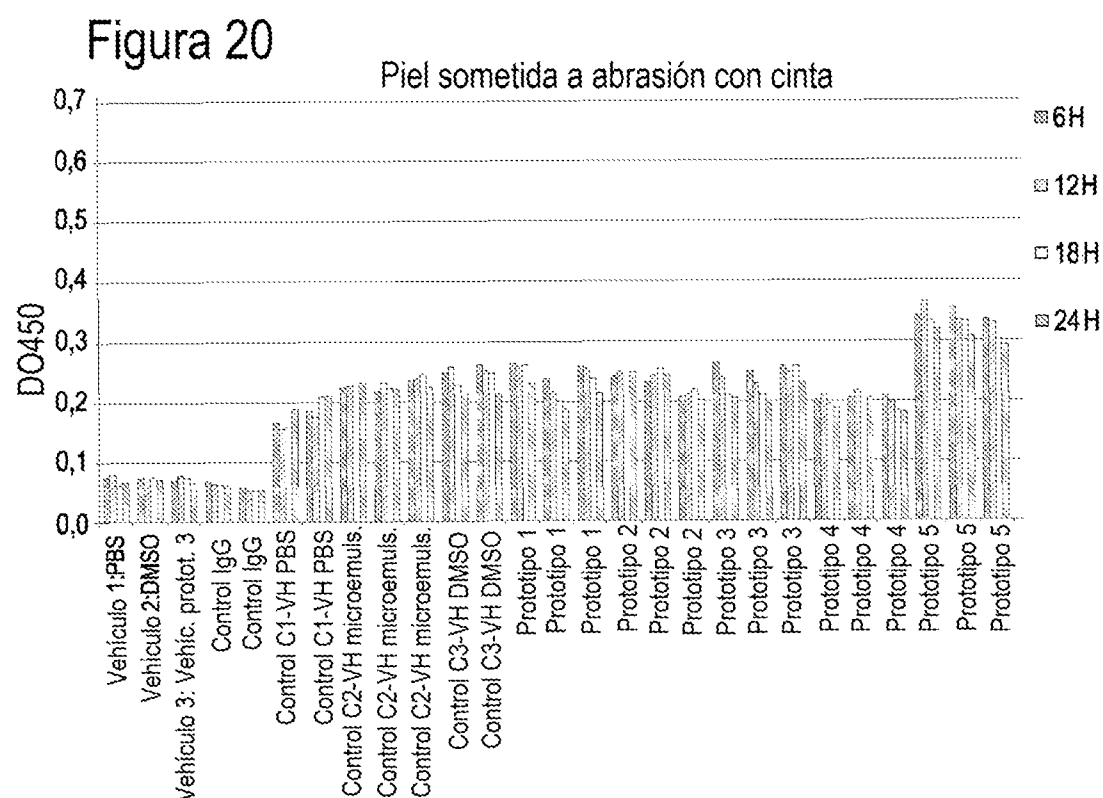
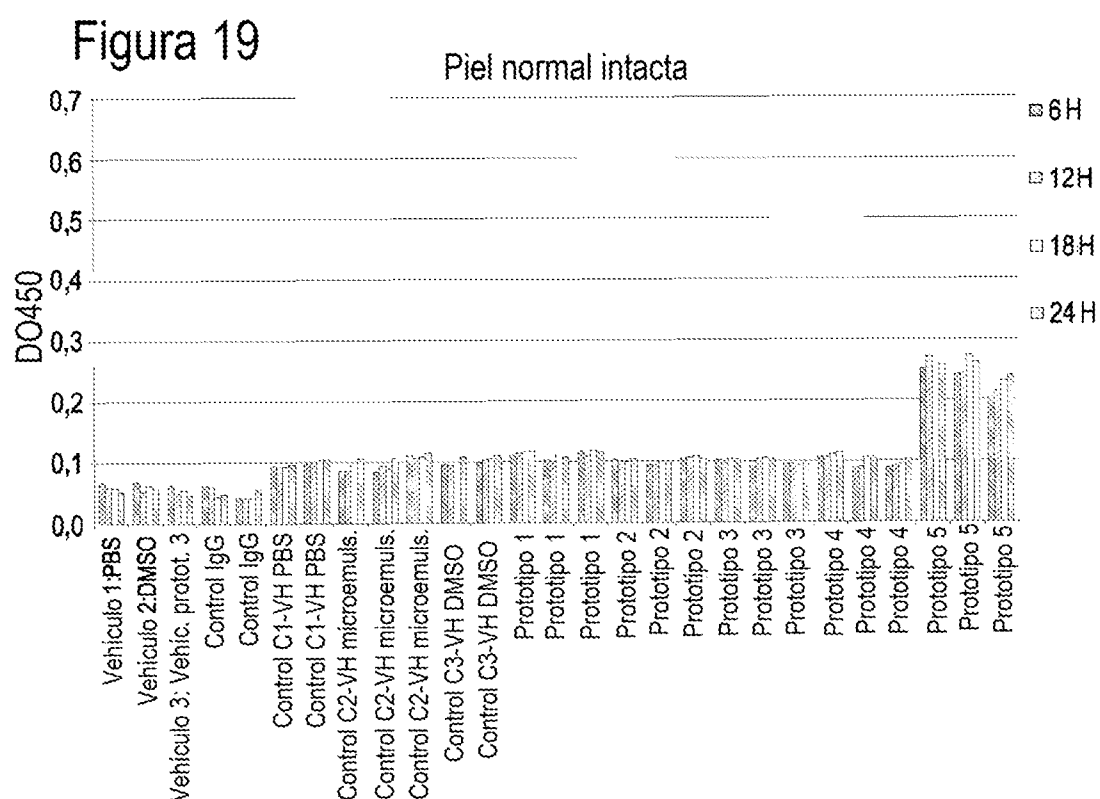


Figura 21

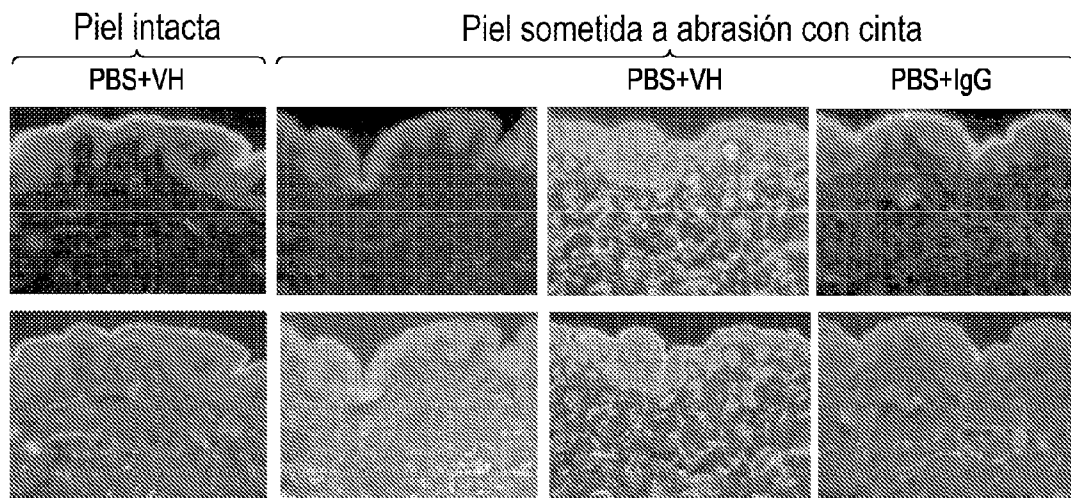


Figura 22

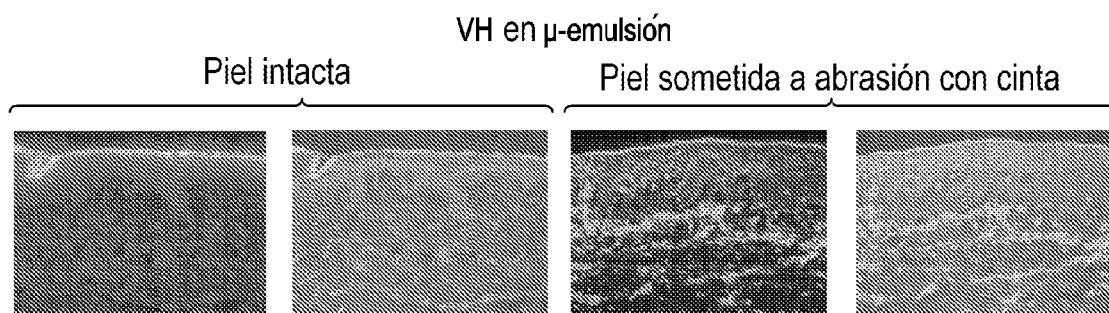


Figura 23

VH en DMSO al 35%

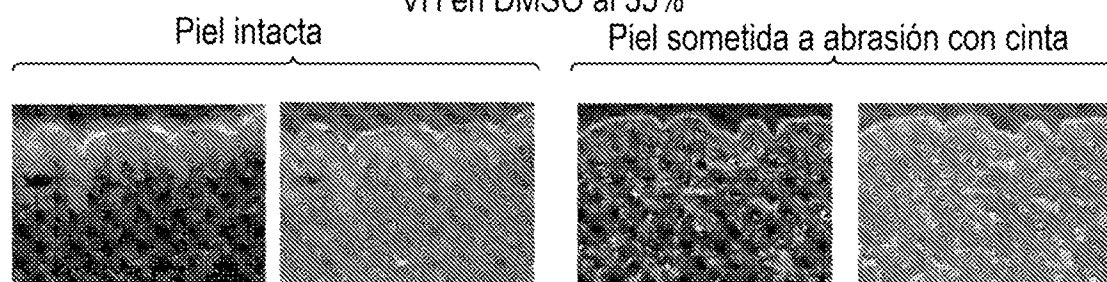


Figura 24

VH en PG al 35%

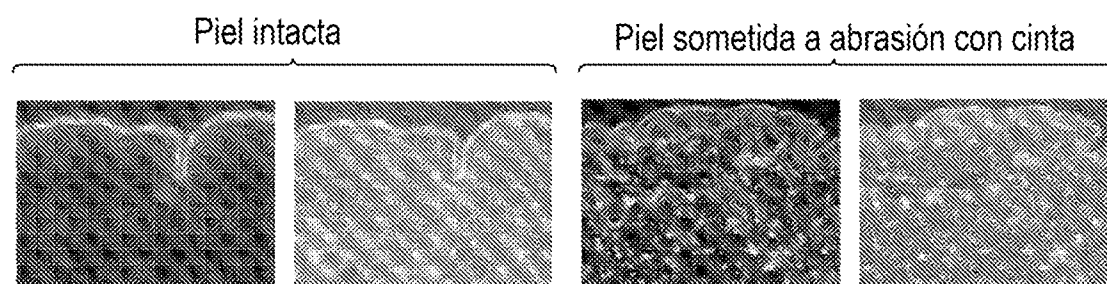


Figura 25

VH en Transcutol al 24%

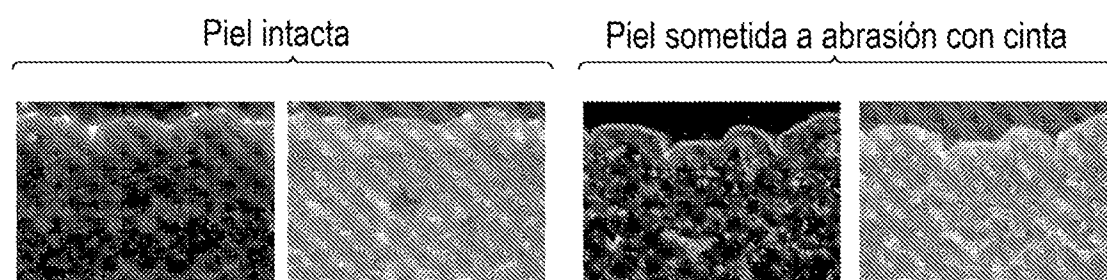


Figura 26

VH en PG al 25% y EtOH al 10%

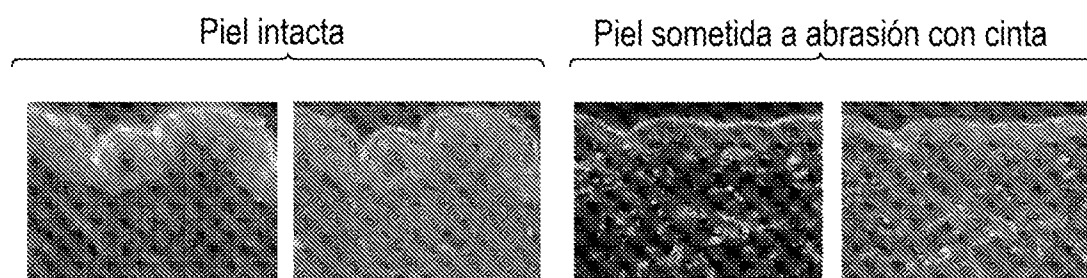


Figura 27

VH en propilenglicol al 20%, miristato de isopropilo al 10%, Brij 721 al 3% y Brij 72 al 2%

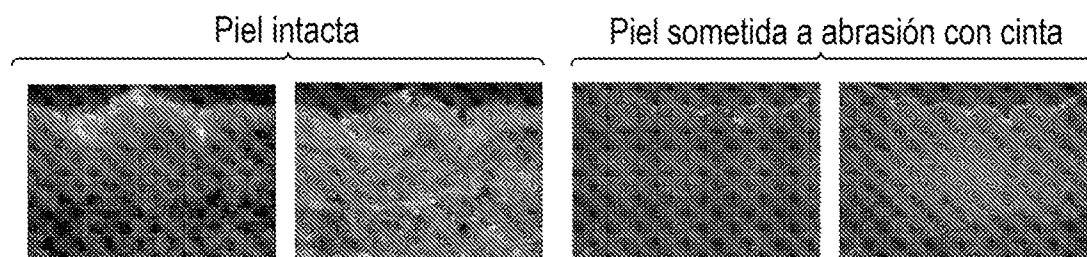


Figura 28

VH en Azone al 10% (laurocapram), Brij 721 al 3% y Brij 72 al 2%

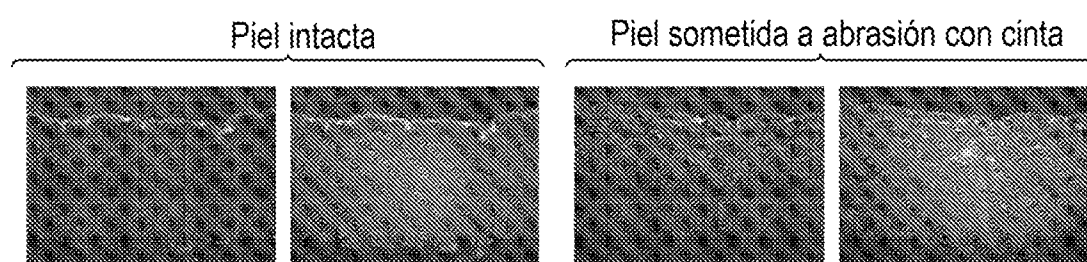


Figura 29

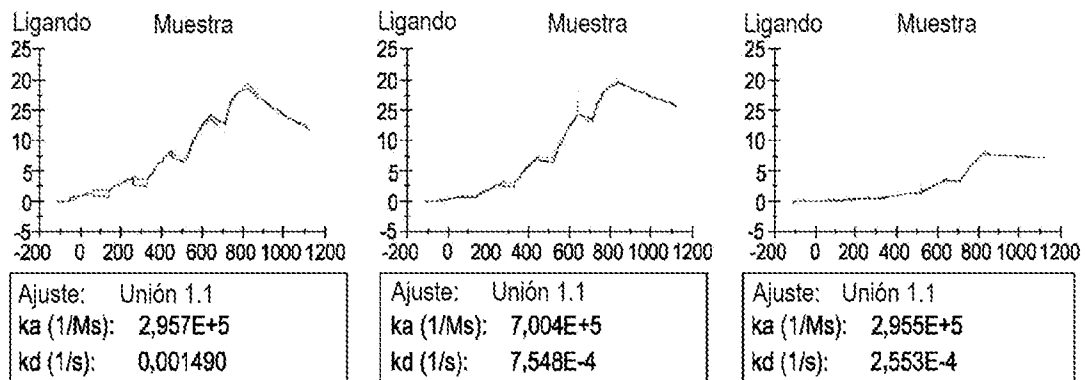
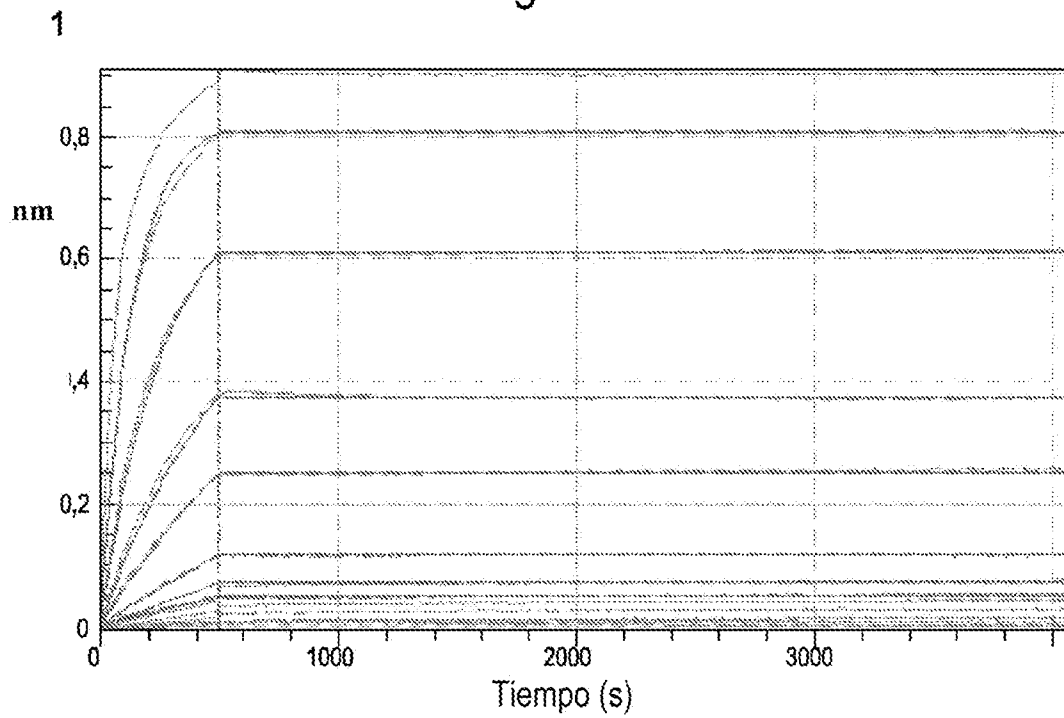


Figura 30



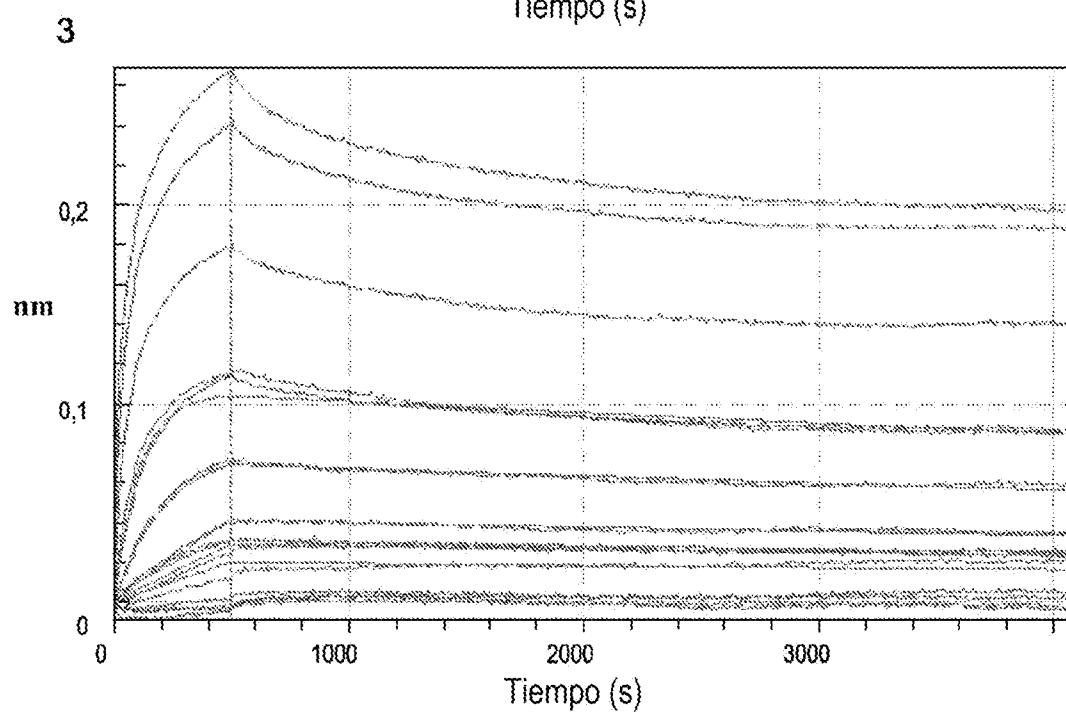
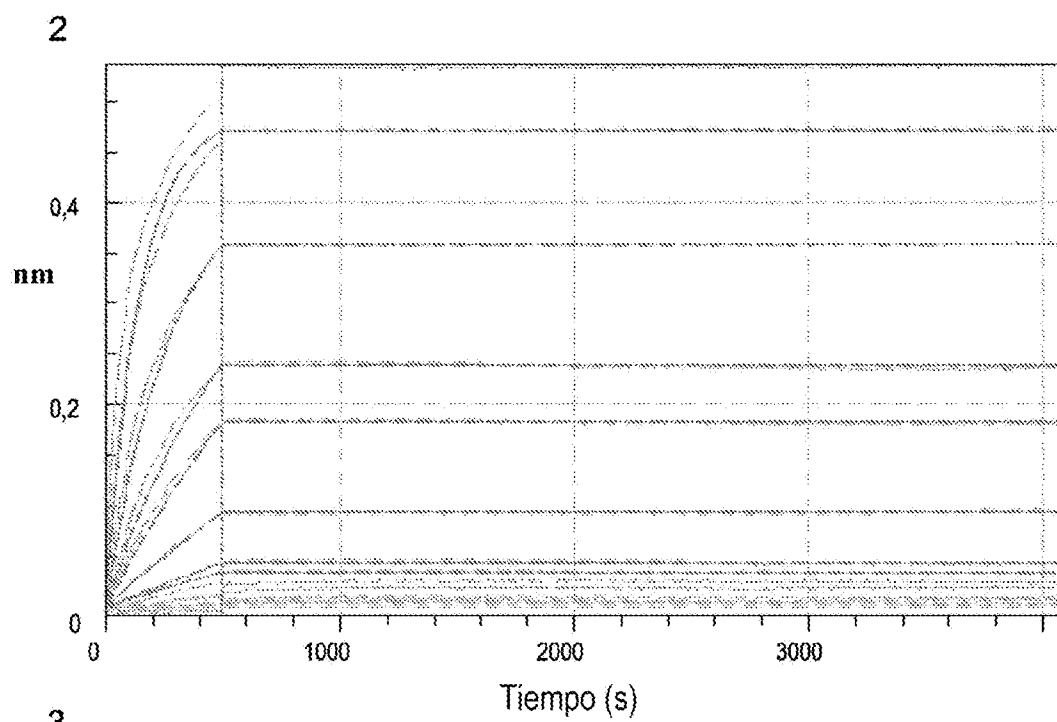
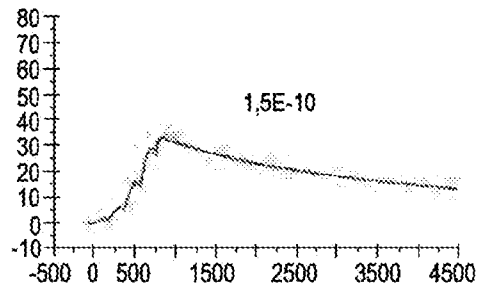


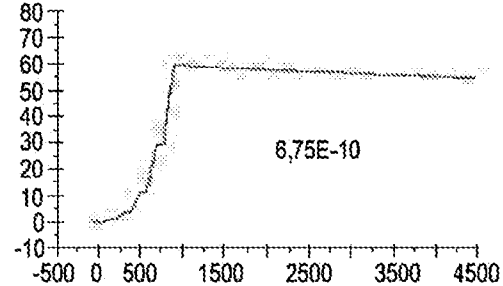
Figura 31

Archivo: 180615 bi KD placa 2 v2 1
 Elem.:
 Ligando -17 Muestra:
 Curva Fc=2-1 Temperatura: 25°



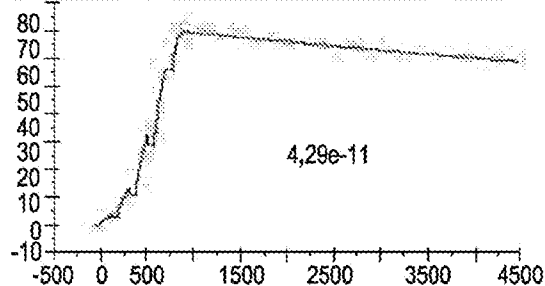
Ajuste: Unión 1.1
 ka (1/Ms): 2,957E+5
 kd (1/s): 3,487E-4

Archivo: 180615 bi KD placa 2 v2 2
 Elem.:
 Ligando 11-17 Muestra:
 Curva Fc=2-1 Temperatura: 25°



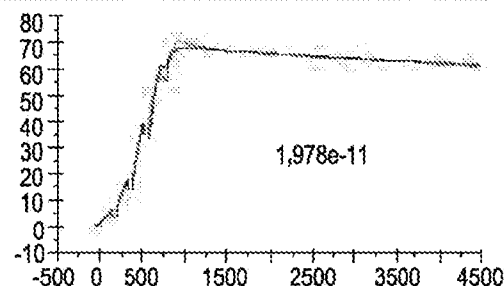
Ajuste: Unión 1.1
 ka (1/Ms): 3,347E+4
 kd (1/s): 2,262E-5

Archivo: 180615 bi KD placa 2 v2 3
 Elem.:
 Ligando 11-17 Muestra:
 Curva Fc=2-1 Temperatura: 25°



Ajuste: Unión 1.1
 ka (1/Ms): 1,104E+6
 kd (1/s): 4,745E-5

Archivo: 180615 bi KD placa 2 v2 4
 Elem.:
 Ligando 11-17 Muestra:
 Curva Fc=2-1 Temperatura: 25°



Ajuste: Unión 1.1
 ka (1/Ms): 1,524eE+6
 kd (1/s): 3,016E-5

Figura 32

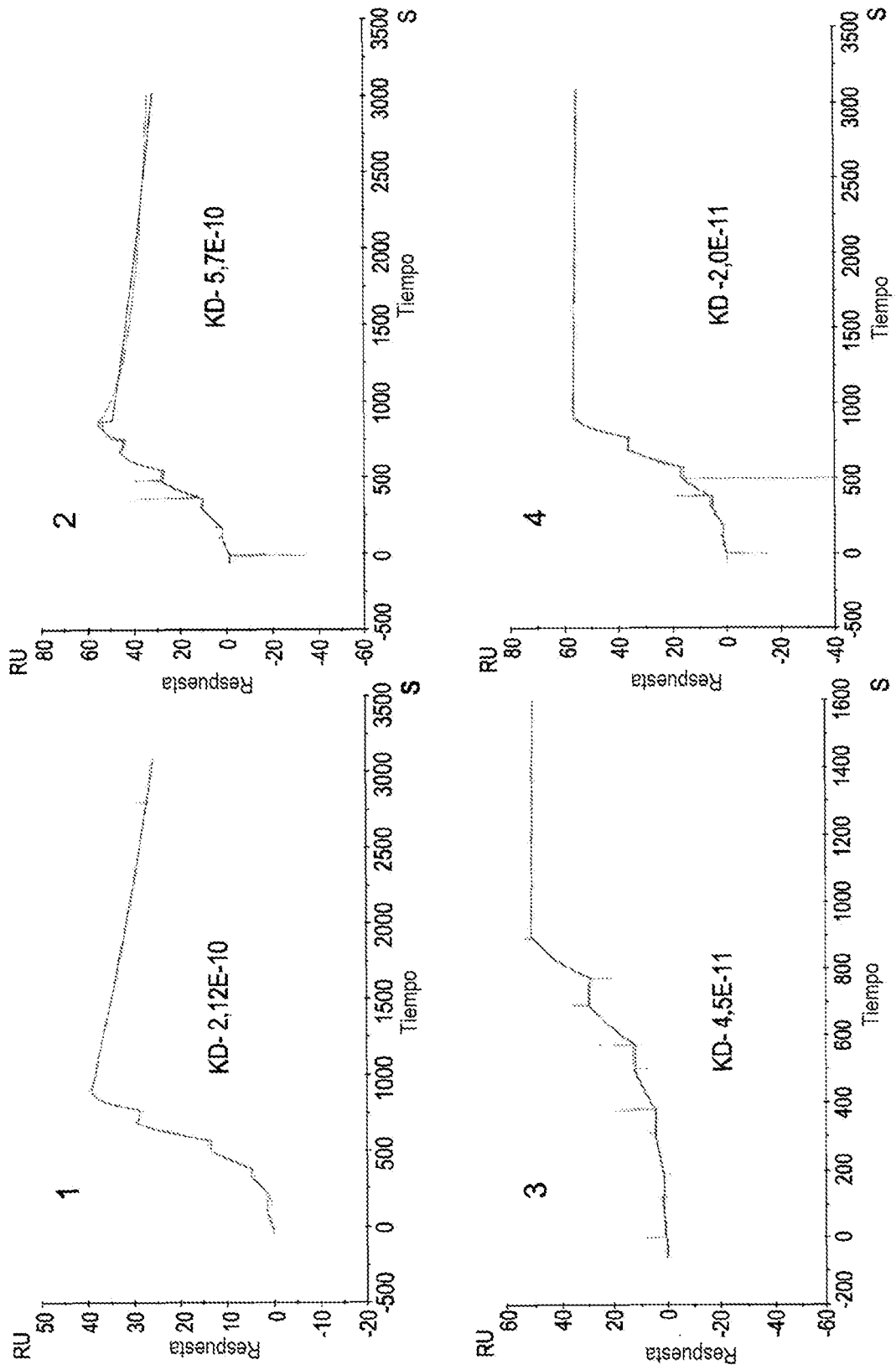
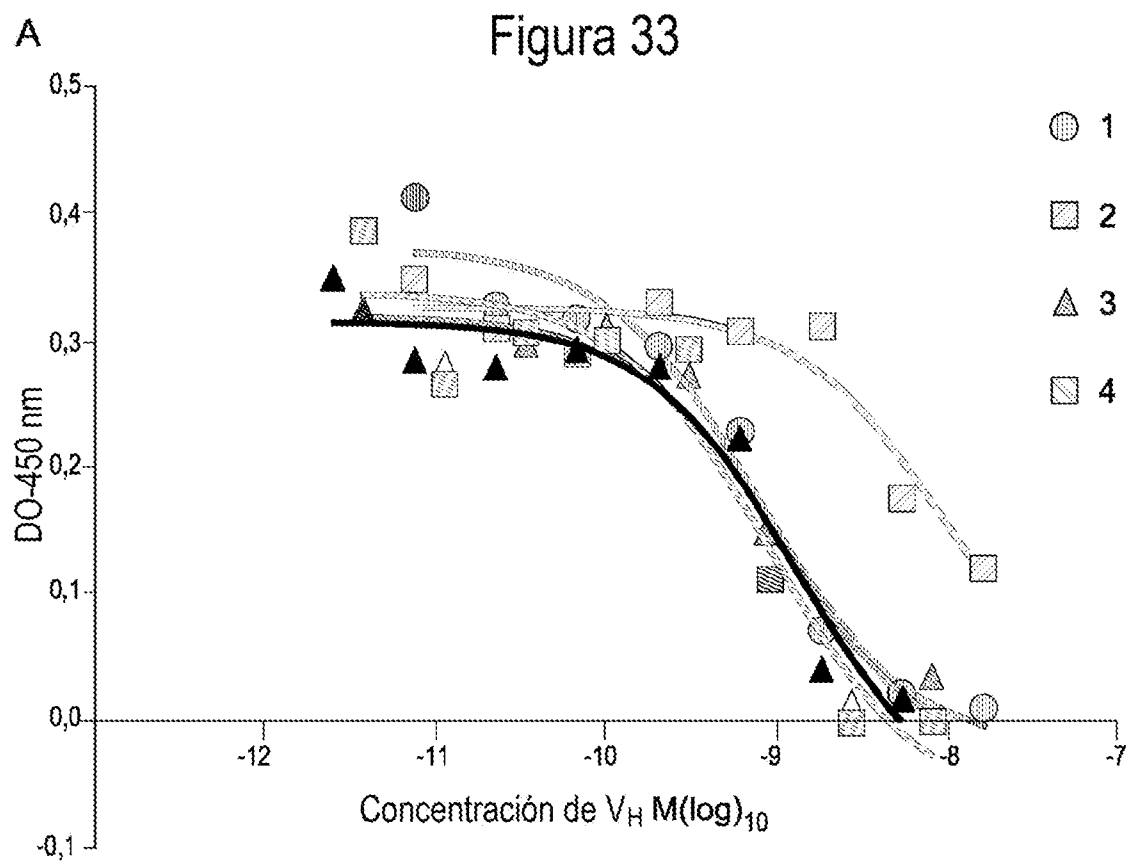


Figura 33

**B**

	1	2	3	4
CE50	7,870e-010	1,032e-008	1,071e-009	9,234e-010