República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 0713382-0 A2**

BRPI0713382A2

(22) Data de Depósito: 20/06/2007
(43) Data da Publicação: 29/05/2012
(RPI 2160)

(51) Int.Cl.:
C07K 16/24
A61K 39/395

(54) Título: MEMBRO DE LIGAÇÃO ISOLADO PARA IL-17A HUMANA, MOLÉCULA DE ANTICORPO ISOLADA, DOMÍNIOS VH E VL, COMPOSIÇÃO, USO DE MEMBRO DE LIGAÇÃO, MÉTODO PARA TRATAR UM DISTÚRBIO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM MEMBRO DE LIGAÇÃO, MOLÉCULA DE ANTICORPO OU DOMÍNIOS VH OU VL, UMA COMPOSIÇÃO, E UM DOMÍNIO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DE ANTICORPO PARA IL-17A HUMANA

(30) Prioridade Unionista: 23/06/2006 US 60/815828, 24/04/2007 US 60/913566

(73) Titular(es): Astrazeneca AB, Medimmune Limited

(72) Inventor(es): Caroline Langham, Caroline Russell, Duncan Cochrane, Fraser Welsh, Matthew Sleeman, Maurice Needham, Patrick Dufner

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT SE2007000600 de 20/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/149032de 27/12/2007

(57) Resumo: MEMBRO DE LIGAÇÃO ISOLADO PARA IL-17A HUMANA, MOLÉCULA DE ANTICORPO ISOLADA, DOMÍNIOS VH E VL,COMPOSIÇÃO, USO DE MEMBRO DE LIGAÇÃO, MÉTODO PARA TRATAR UM DISTÚRBIO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM MEMBRO DE LIGAÇÃO, MOLÉCULA DE ANTICORPO OU DOMÍNIOS VII OU VL, UMA COMPOSIÇÃO, E UM DOMÍNIO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DE ANTICORPO PARA IL- 17A HUMANA Membros de ligação, especialmente moléculas de anticorpo, para a interleucina 17 (IL- 17). Os membros de ligação são úteis para o tratamento de distúrbios associados com a interleucina 17 tais come a artrite reumatóide.

"MEMBRO DE LIGAÇÃO ISOLADO PARA IL-17A HUMANA, MOLÉCULA DE ANTICORPO ISOLADA, DOMÍNIOS VH E VL, COMPOSIÇÃO, USO DE MEMBRO DE LIGAÇÃO, MÉTODO PARA TRATAR UM DISTÚRBIO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM MEMBRO DE LIGAÇÃO, MOLÉCULA DE ANTICORPO OU DOMÍNIOS VH OU VL, UMA COMPOSIÇÃO, E UM DOMÍNIO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DE ANTICORPO PARA IL-17A HUMANA"

Esta invenção diz respeito a membros de ligação para a interleucina 17 (IL-17, também aludida como IL-17A), especialmente às moléculas de anticorpo e seu uso terapêutico por exemplo, no tratamento de distúrbios associados com IL-17 tais como a artrite reumatóide.

A IL-17A é uma citocina derivada de célula T, que tem atividades pró inflamatórias pleitrópicas. *In vitro*, a IL-17A regula a produção de mediadores inflamatórios de fibroblastos e sinoviócitos, pode sinergizar com outras citocinas pró inflamatórias e pode promover a degradação da cartilagem e reabsorção óssea osteoclástica.

A IL-17A é um homodímero que consiste de duas cadeias de 155 aminoácidos. Cada cadeia de polipeptídeo inclui um peptídeo de terminal N de 23 aminoácidos que é clivado para produzir um polipeptídeo maduro de 132 resíduos. A IL-17A liga-se e exerce seus efeitos por intermédio da ativação dos receptores de IL-17 A e C (Toy *et al* 2006). Cinco homólogos de IL-17A existem, designados IL-17B a IL-17F, todos com papéis biológicos divergentes e distintos. Os números de acesso da Swissprot para os homólogos de IL-17 são: IL-17B Q9UHF5; IL-17C Q96P0M4; IL-17D Q8TAD2; IL-17E Q9H293; IL-17F Q96PD4. IL-17B e IL-17C tem uma ampla expressão em tecido com a origem celular das proteínas desconhecidas, embora os transcritos de IL-17B possam ser encontrados em níveis altos no sistema nervoso (Moore *et al* 2002). IL-17B e IL-17C podem induzir TNFα a

partir da linhagem de célula monocítica THP-1 (Li *et al* 2000) e induzir a neutrofilia quando injetada em modelos de camundongo (Shi *et al* 2000). A IL-17D é detectada em tecidos múltiplos e é expressada em células T CD4+ e células B CD19+ em repouso (Starnes *et al* 2002). A IL-17E (IL-25) evoca respostas do tipo Th2 tais como a hiper responsividade das vias aéreas e eosinofilia e tem propriedades distintas dos outros membros da família (Fort *et al* 2001). A IL-17F existe como duas isoformas e exibe a maior homologia com IL-17A (55 e 40% de homologia) e compartilha muitas propriedades funcionais similares tais como a indução de neutrofilia nos pulmões e indução de citocinas pró inflamatórias incluindo IL-8 (Hymowitz *et al* 2001; Hurst *et al* 2002, Oda *et al.* 2005). Os membros da família IL-17 podem ter um papel na imunidade inata e adaptiva conseqüentemente um anticorpo que alveja apenas IL-17A garantirá que os efeitos específicos da sinalização de IL-17A serão suprimidos em áreas onde IL-17A é expressada.

A ligação entre membros da família e a família do receptor de IL-17 não é completamente entendida. A IL-17E é conhecida sinalizar por intermédio de IL-17RB embora IL-17B também tenha sido relatada ligar com afinidade mais baixa (Lee *et al.* 2001). A IL-17A tem sido relatada ligar IL-17RC (IL-17RL) além da IL-17RA e similarmente IL-17F compartilha a ligação com estes receptores (Toy *et al.* 2006, Kuestner *et al.* 2005). Outros receptores, IL-17RD e IL-17RE existem embora seus ligandos endógenos estejam ainda para serem identificados. As variantes de junção múltiplas existem para IL-17RC e IL-17RD (Haudenschild *et al.* 2002; Haudenschild *et al.* 2006; Moseley *et al.* 2003).

A ligação de IL-17A ao seu receptor é provável de induzir a oligomerização do receptor resultando na sua ativação. A ativação de IL-17RA pela IL-17A ativa vários caminhos do sinal pró-inflamatório tais como a proteína quinase regulada pelo sinal extracelular (ERK1/2), quinase de terminal N *c-jun* (JNK) e caminhos da MAP quinase de *p38*. A ativação

destes caminhos deflagra mudanças nos níveis de expressão de uma faixa de genes e proteínas pró-inflamatórias, por intermédio de mecanismos que não são completamente definidos.

A IL-17A é secretada primariamente pela células T CD4+ e CD8+ (Lubberts *et al.* 2001). A IL-17A, como seu RNA ou proteína intracelular, também foi detectada em neutrófilos, eosinófilos e monócitos de sangue humano (Molet *et al.* 2001; Ferretti *et al.* 2003). A IL-6 e TGFP recentemente foram implicadas na diferenciação de células T ingênuas em células T que produzem IL-17 (Betteli *et al.* 2006), enquanto duas outras citocinas implicadas na artrite reumatóide, IL-15 e IL-23, regulam a liberação de IL-17A de linfócitos T.

IL-17A supra regula a produção de citocinas inflamatórias e produção de prostaglandina a partir de fibroblastos sinoviais, realça a produção de MMP a partir de fibroblastos sinoviais e condrócitos articulares e podem desempenhar um papel na reabsorção óssea osteoclástica. No contexto do ambiente inflamatório no tecido da artrite reumatóide (RA), a IL-17A pode ter um papel particular em sinergizar com outras citocinas pró inflamatórias notavelmente TNF-α e IL-1β.

Diversas linhas de evidência sugerem um papel importante para IL-17 na patogênese da artrite reumatóide (RA). A IL-17A funcional foi espontaneamente secretada pelos explantes sinoviais 16/18 RA comparados com os explantes 2/12 OA e explantes sinoviais normais 0/3. O imunotingimento do sinóvio de RA revelou células que produzem IL-17A na área rica em célula T (Chabaud *et al.* 1999). O nível de IL-17A no soro de pacientes RA é elevado comparado com soro de controle normal (Cho *et al.* 2004).

IL-17A foi mostrada estimular a liberação de uma faixa de citocinas pró inflamatórias. IL-17A, algumas vezes atuando em sinergia com outras citocinas, realça a produção de IL-1, IL-6 e LIF de fibroblastos

sinoviais (Katz *et al.* 2001; Chabaud *et al.* 1998). Adicionalmente, IL-17A foi mostrada supra regular a expressão de COX-2 em células inflamatórias.

A IL-17A induz a expressão de gene COX-2 em condrócitos humanos, fibroblastos sinoviais e macrófagos e explantes sinoviais humanos (por exemplo, Faour *et al.* 2003; Le Grand *et al.* 2001). A IL-17A recombinante supra regula a expressão de COX-2 de sinoviócito e realça a expressão de COX-2 de sinoviócito estimulada pelo TNFα (Stamp *et al.* 2004).

Além destas atividades pró-inflamatórias "clássicas", a IL-17A também evoca outros efeitos na junta RA tal como a promoção da degradação de cartilagem. A IL-17 também foi mostrada estar envolvida na supra regulagem de MMPs e impacto na degradação da cartilagem. A IL-17A aumenta a produção espontânea de MMP1 pelos sinoviócitos de RA humanos. A IL-17A coordenadamente supra regula os genes MMP3, MMP13 e ADAMTS4 em condrócitos articulares bovinos (Silvester *et al.* 2004). A IL-17A é um indutor potente da decomposição da matriz e um inibidor da síntese de matriz em explantes de cartilagem articular (Cal *et al.* 2001). Um mecanismo pelo qual a IL-17A suprime a síntese de matriz pelos condrócitos articulares é através do realce da produção de NO (Lubberts *et al.* 2000). IL-17A adenoviral injetada na junta do joelho de camundongos imunizados com colágeno tipo II acelera o início, agrava a inflamação sinovial e realça a destruição da junta neste sítio (Lubberts *et al.* 2001). A IL-17A também pode estar envolvida na reabsorção óssea osteoclástica na R.A. (Kotake *et al.* 1999).

Um aspecto importante da biologia de IL-17A é a sua capacidade para sinergizar com outras citocinas. Por exemplo, IL-17A realça a síntese induzida por TNF-α de IL-1, IL-6 e IL-8 em fibroblastos sinoviais (Katz *et al.* 2001). Adicionalmente, na linhagem de célula osteoblástica, MC-3T3, IL-17 e TNF-α exibem sinergia potente na mediação da secreção de IL-6

(Ruddy *et al.* 2004). A IL-17A realça a produção de IL-6 e LIF induzida por IL-1P pelos sinoviócitos RA (Chabaud *et al.* 1998).

O papel de IL-17A na RA é ainda sustentado pela evidência de modelos de animal da doença. A superexpressão de IL-17A induz o dano da cartilagem na artrite induzida pela parede celular estreptocócica (SCW) em camundongos deficientes em IL-1 (Koenders *et al.* 2005b). Em um modelo de artrite induzida por colágeno (CIA), a superexpressão de IL-17A realça a artrite (Chabaud & Miossec 2001). Adicionalmente, a CIA é suprimida em camundongos deficientes em IL-17A ou em camundongos tratados com mAb anti-IL-17 (Nakae *et al.* 2003; Lubberts *et al.* 2001; Lubberts *et al.* 2004).

Além do seu papel na RA, a atividade de IL-17A foi ligada com várias outras patologias incluindo:

- osteoartrite (por exemplo, Honorati *et al.* 2002); Malemud *et al.* 2004);
- perda óssea (Lubberts *et al.* 2003) e afrouxamento de implantes ósseos (Van Bezooijen *et al.* 1999);
- hipersensibilidade das vias aéreas incluindo doença das vias aéreas alérgicas tais como asma (Molet *et al.* 2001; Wong *et al.* 2001; Linden 2006) e ARDS;
- distúrbios desmielinantes incluindo esclerose múltipla (Lock *et al.* 2002; Touil *et al.* 2006);
- psoríase (Teunissen *et al.* 1998) e artrite psoriática;
- hipersensibilidade dérmica incluindo dermatite atópica (Toda *et al.* 2003);
- rejeição a transplante aguda (Antonysamy *et al.* 1999; Yoshida *et al.* 2006; Tang *et al.* 2001);
- rejeição de aloenxerto (Hsieh *et al.* 2001);
- doença do hospedeiro versus enxerto;
- esclerose sistêmica (Kurasawa *et al.* 2000);

- lupo eritematoso sistêmico (Wong *et al.* 2000);

- doenças intestinais inflamatórias autoimunes incluindo colite ulcerativa (Nielsen *et al.* 2003; Fujino *et al.* 2003; Yen *et al.* 2006) e doença de Crohn;

- distúrbios inflamatórios urológicos incluindo hiperplasia prostática benigna (Kramer & Marberger 2006);

- doença cardiovascular incluindo aterosclerose (Csiszar & Ungvari 2004), doença de Kawasaki (Sohn *et al.* 2003), doença cardíaca isquêmica (Csiszar 2003) e acidente vascular cerebral;

- vasculite incluindo doença de Behcet (Hamzaoui *et al.* 2002);

- febres periódicas incluindo a febre do mediterrâneo familiar (Haznedaroglu *et al.* 2005);

- metabolismo de glicose incluindo diabete do tipo 1 e tipo 2 (Fisman 2003);

- doenças pulmonares incluindo doença pulmonar obstrutiva crônica (Shen *et al.* 2004a; Shen *et al.* 2004b), bronquite, enfisema, síndrome da bronquiolite obliterativa (Vanaudenaerde *et al.* 2003) e fibrose pulmonar;

- cânceres incluindo linfoma (Maggio *et al.* 2002) e tumores (Numasaki *et al.* 2005);

- peridontite (Vernal *et al.* 2005; Takahashi 2005);

- doenças causadas pela infecção viral incluindo queratite estrômica herpética (Maertzdorf *et al.* 2002);

- outros distúrbios inflamatórios mediados pela IL-17 incluindo por exemplo alergias, artrite reativa, dor inflamatória, espondiloartropatias incluindo espondilite ancilosante, doença inflamatória da pele e córnea, distúrbios musculares inflamatórios;

- outras reações inflamatórias agudas mediadas pela IL-17 tais como infecções incluindo septicemia, choque séptico e endotóxico, meningite e trauma (cirurgia);

- outros distúrbios autoimunes mediados pela IL-17 incluindo por exemplo distúrbios hematológicos autoimunes, doenças de Alzheimer, sarcoidose, cirrose, vesícula biliar e hepáticas incluindo hepatite, glomerulonefrite;

- outros distúrbios metabólicos mediados pela IL-17 incluindo por exemplo dislipidemia.

O bloqueio de IL-17A *in vivo* suprime a inflamação, destruição da junta e progressão de doença em vários modelos de artrite. O uso de proteínas de fusão IL-17R Fc tem demonstrado a supressão de dano à junta ao nível macroscópico em CIA de murino (Lubberts *et al.* 2001) e também pela análise histológica em modelos de artrite induzida por adjuvante em rato (AIA) de artrite (Bush *et al.* 2002). O uso de anticorpos neutralizadores comerciais para IL-17 (anti-camundongo de rato) e IL-17R (anti-camundongo de rato) têm demonstrado a inibição do intumescimento e início da artrite em um modelo infeccioso de artrite (Burchill *et al.* 2003). Anticorpos policlonais anti-camundongo de coelho foram usados em modelos de murino de artrite demonstrando gravidade diminuída de dano à junta e destruição de cartilagem e redução nos níveis de mediadores pró-inflamatórios incluindo RANKL, IL-1β e IL-6 (Lubberts *et al.* 2004; Koenders *et al.* 2005a).

A neutralização de IL-17 tem demonstrado efeitos funcionais em outros modelos de animal de uma faixa de doenças. A proteína de fusão de IL-17R Fc prolongou a sobrevivência em um modelo de aloenxerto de camundongo (Antonysamy *et al.* 1999). A proteína de fusão IL-17R IgG também atenuou a inflamação colônica em um modelo de camundongo de colite induzida pelo ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) (Zhang *et al.* 2006). anti-IL-17 monoclonal comercial demonstrou eficácia em um modelo de camundongo de asma pela redução da neutrofilia brônquica na inoculação de Ova (Hellings *et al.* 2003). Os anticorpos neutralizadores de IL-17 policlonais de coelho também reduziram a adesiogênese em um modelo de

rato de adesão cirúrgica em uma maneira dependente da dose (Chung *et al.* 2002).

Anticorpos para IL-17A foram descritos. Por exemplo, um anticorpo monoclonal anti-IL-17 de murino MAB317 foi produzido pela R&D Systems. Este anticorpo IgG2B foi desenvolvido a partir de um hibridoma de camundongo evocado de um camundongo imunizado com IL-17 recombinante humana purificada (derivada de *E. coli*). Adicionalmente um outro anticorpo anti-IL-17 de murino 53.159.16 (Biosource Inc.) foi desenvolvido que tem propriedades neutralizantes. Este anticorpo de IgG1K foi desenvolvido a partir de um hibridoma de camundongo evocado de um camundongo (Balb/c) imunizado com IL-17 humano recombinante purificado. Este anticorpo reconhece IL-17 humano natural e recombinante.

A WO2006/054059 (UCB CellTech) descreve uma molécula de anticorpo neutralizante para IL-17A. Um fragmento de anticorpo PEguilado é descrito, que foi derivado de uma versão da linha germinativa de um anticorpo anti-IL-17 originalmente isolado de um hibridoma. O documento relata que usando BIAcore o fragmento de anticorpo foi determinado ter uma afinidade para IL-17 na faixa de 133 a 365 μM.

A WO2006/013107 (Novartis Pharma GmbH) descreve membros de ligação para IL-17A, em particular um anticorpo de IgG1 anti-IL-17 humano designado AIN457, que foi isolado de um hibridoma. A WO2006/013107 relata medições da afinidade BIAcore (Kd) para a interação entre AIN457 recombinante e IL-17 de ser humano (0,227 nM), sagüi (1,2 nM), macaco rhesus (9 nM) e macaco cinomolgo (6 nM), indicando uma diferença de aproximadamente 25 vezes na afinidade quanto a IL-17 humana e de cinomolgo respectivamente.

Os membros de ligação para IL-17A, também aludidos como membros de ligação de IL-17A, são aqui descritos. Membros de ligação da invenção podem ser moléculas de anticorpo, especialmente moléculas de

anticorpo humanas, para IL-17A.

Os membros de ligação são úteis para tratar distúrbios associados com IL-17A, por exemplo, um ou mais dos distúrbios relacionados com IL-17 aludidos em outro lugar aqui, tal como a artrite reumatóide.

São aqui descritos membros de ligação que se ligam dentro da região de posições 71 a 87 da IL-17A humana madura. As posições 71 a 87 têm a seqüência Cys-Arg-His-Leu-Gly-Cys-Ile-Asn-Ala-Asp-Gly-Asn-Val-Asp-TyrHis-Met (SEQ ID NO: 199).

Um membro de ligação da invenção pode ligar pelo menos um resíduo de Cys-Arg-His-Leu-Gly-Cys-Ile-Asn-Ala-Asp-Gly-Asn-Val-Asp-Tyr-His-Met (SEQ ID NO: 199). O mesmo por exemplo pode ligar um, dois, três, quatro, cinco ou mais do que cinco resíduos da SEQ ID NO: 199.

Um membro de ligação da invenção pode ligar a IL-17A humana madura (SEQ ID NO: 198) no resíduo Leu74, Tyr85, His86 e/ou Met 87. Por exemplo o mesmo pode ligar Leu74, Tyr85 e/ou His86. O membro de ligação pode ligar todos estes resíduos. A ligação pode ser determinada por exemplo pela detecção ou observação de interações específicas entre o membro de ligação e os resíduos de IL-17A, por exemplo, em uma estrutura do complexo de membro de ligação:IL-17A que podem ser determinadas por exemplo usando a cristalografia de raio X. Uma estrutura de Anticorpo 7 ligada à IL-17A humana determinada usando a cristalografia de raio X indicou que o Anticorpo 7 liga os resíduos 74 (Leu), 85 (Tyr), 86 (His) e 87 (Met) da seqüência madura (SEQ ID NO: 198).

Opcionalmente um membro de ligação pode ligar resíduos flanqueadores ou resíduos estruturalmente vizinhos na molécula de IL-17A, além da ligação de um ou mais resíduos dentro da SEQ ID NO: 199. Por exemplo um membro de ligação pode ligar Asn88.

Um membro de ligação da invenção pode ligar a IL-17A humana madura (SEQ ID NO: 198) em um ou mais, por exemplo, cinco ou

mais, por exemplo, dez ou mais, por exemplo, todos, dos seguintes resíduos:

Ser40
Ser41
Asp42
Tyr43
Arg46
Leu74
Tyr85
His86
Met87
Asn88
Pro126
Ile127.

Um membro de ligação da invenção pode ligar a IL-17A humana madura no resíduo Ser40, Ser41, Asp42, Tyr43 e/ou Arg46.

Um membro de ligação da invenção pode ligar a IL-17A humana madura no resíduo Tyr85, His86, Met87 e/ou Asn88.

Um membro de ligação pode ligar a IL-17A humana madura em Pro126 e/ou Ile127.

Como mencionado em outro lugar aqui, a IL-17A forma um dímero de duas cadeias de polipeptídeo. Um membro de ligação ou um domínio VH da invenção pode ligar cada um dos dois polipeptídeos de IL-17A maduros em um dímero.

Por exemplo, o membro de ligação pode ligar um polipeptídeo de IL-17A do dímero em Tyr85, His86, Met87 e/ou Asn88 e/ou pode ligar o mesmo polipeptídeo em Pro126 e/ou Ile127 e/ou pode ligar o outro polipeptídeo de IL-17A do dímero em Ser40, Ser41, Asp42, Tyr43 e/ou Arg46.

Qualquer método adequado pode ser usado para determinar a

seqüência de resíduos ligados por um membro de ligação, por exemplo, troca de hidrogênio-deutério, mutagênese direcionada ao sítio, espectrometria de massa, RMN e cristalografia de raio X.

O uso da cristalografia de raio X para determinar a estrutura 3-dimensional precisa de proteínas na resolução atômica é bem conhecida por aqueles na técnica e foi usada para visualizar em detalhes as partes de proteínas que interagem com anticorpos (Padavattan *et al*, 2007; Karpusas *et al.*, 2001). Uma vez que os cristais do membro de ligação complexados com o antígeno alvo são obtidos, eles são irradiados com raios X para dar um padrão de difração, que depende da distribuição atômica exata. O padrão de difração pode ser analisado pelos cristalógrafos para determinar as coordenadas posicionais tridimensionais de cada átomo na estrutura. Isto permite uma inspeção detalhada dos sítios de interação entre o membro de ligação e a IL-17A.

Assim, os resíduos de IL-17A ligados por um membro de ligação podem ser determinados pela observação de interações entre o membro de ligação e os resíduos de IL-17A em uma estrutura cristalina de raio X do membro de ligação ligado à IL-17A. A ligação por exemplo pode compreender a ligação de hidrogênio e/ou interações não polares (hidrofóbicas). Uma distância de corte de 3,2 Å pode ser usado para determinar as ligações de hidrogênio e uma distância de corte de 4,0 Å pode ser usada para determinar as interações não polares. Um exemplo de uma determinação da estrutura cristalina por raio X e identificação de resíduos ligados está apresentada no Exemplo 7.4 aqui.

A troca de hidrogênio da amida do peptídeo é uma metodologia muito bem descrita usada para estudar proteínas (Englander *et al* 1994). Mais recentemente isto foi mais desenvolvido para usar proteínas rotuladas com deutério que podem trocar prótons e ligar estes à espectrometria de massa para medir as taxas de troca através de uma proteína

integral (Pantazatos *et al.*, 2004). Esta taxa de troca de hidrogênio/deutério (troca H/D) pode ser modificada significantemente pela acessibilidade ao solvente tal que quando uma parte da proteína está envolvida na ligação a uma outra molécula a taxa de troca diminuirá significantemente. Este método foi usado para mapear as regiões de uma proteína envolvida na influência com anticorpos (Lu *et al* 2005) e foi usada para investigar regiões de IL-17A envolvidas nos anticorpos de ligação da invenção, como detalhado no Exemplo 7.1 aqui. A espectrometria de massa foi usada em conjunção com a troca H/D, para identificar as regiões de IL-17A em contato com um membro de ligação. Pode ser demonstrado por exemplo que a troca H/D para os resíduos dentro da SEQ ID NO: 199 é significantemente diminuída quando a IL-17A está ligada a um membro de ligação da invenção.

A mutagênese de aminoácidos únicos e regiões de proteínas de modo a correlacionar a estrutura com a atividade é bem conhecida por uma pessoa habilitada na técnica e foi usada para definir regiões de proteínas que se ligam aos anticorpos (Lu *et al* 2005). Os exemplos do uso destas técnicas para os membros de ligação da invenção são mostrados no exemplo 7.2.

A ligação a e/ou neutralização de IL-17A humana mutante tendo a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 201 podem ser usadas para avaliar se um membro de ligação liga dentro da região de posições 71 a 87 da IL-17A humana madura. A ausência de ligação ou neutralização ou ligação ou neutralização significantemente reduzida, com IL-17A mutante comparado com o tipo selvagem indica que um membro de ligação liga pelo menos um resíduo de SEQ ID NO: 199.

Um membro de ligação da invenção opcionalmente pode não ligar e/ou neutralizar a IL-17A humana mutante tendo a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 201. Por exemplo, um membro de ligação da invenção pode não inibir a ligação de IL-17A humana mutante SEQ ID NO: 201 ao seu receptor. A neutralização de IL-17A pode ser determinada por uma

variedade de ensaios, os exemplos dos quais são em outro lugar aqui descrito.

Um membro de ligação da invenção pode não inibir a liberação de IL-6 induzida pela IL-17A humana mutante (SEQ ID NO: 201) em células HT1080. Um membro de ligação da invenção pode não mostrar nenhuma potência de neutralização significante em um ensaio de liberação de IL-6 em células HT1080 usando IL-17A mutante (SEQ ID NO: 201) a uma concentração de 2 nM, por exemplo, quando o membro de ligação está a uma concentração de até 50 nM.

Em um ensaio de liberação de IL-6 em células HT1080, um membro de ligação da invenção pode ter um IC50 maior do que 10 vezes mais alta, mais do que 20 vezes mais alta, mais do que 50 vezes mais alta ou mais do que 100 vezes mais alta em um ensaio com 1 nM de IL-17A humana mutante (SEQ ID NO: 201) do que em um ensaio com 1 nM ou 2 nM da IL-17A humana madura (SEQ ID NO: 198). Os dados de exemplo são mostrados no Exemplo 7.3 (Tabela 20b), mostrando que o Anticorpo 7 tem uma potência muito mais baixa (IC50 mais alto) para IL-17A mutante comparada com a IL-17A humana madura. É mencionado que nenhum valor IC50 pôde ser determinado para o Anticorpo 7 no ensaio com IL-17A mutante, indicando assim que qualquer valor IC50 foi mais alto do que seria medido neste ensaio.

Como em outro lugar aqui descrito, a ligação de um membro de ligação à IL-17 pode ser determinada usando a ressonância de plasma de superfície por exemplo, BIAcore. Um membro de ligação da invenção por exemplo pode não mostrar nenhuma ligação significante, por exemplo, menos do que cerca de 10 RU em um ensaio de ressonância de plasma de superfície com IL-17A humana mutante tendo a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 201.

Os dados de ressonância de plasma de superfície podem ser ajustados a um modelo de analito bivalente (ka kd simultâneos) e uma constante de afinidade Kd calculada a partir da razão de constantes de taxa

kd1/ka1. Um membro de ligação da invenção pode ter uma afinidade para ligar a IL-17A humana madura (SEQ ID NO: 198) que é mais do que 5 vezes, por exemplo, mais do que 10 vezes ou mais do que 50 vezes, maior do que para ligar a IL-17A humana mutante (SEQ ID NO: 201).

As técnicas tais como cristalografia de raio X também podem ser usadas para identificar resíduos de IL-17A ligados por um membro de ligação e podem ser úteis para confirmar e/ou refinar resultados de outras técnicas, por exemplo, identificar resíduos que são contatados pelo membro de ligação. Uso da cristalografia de raio X de proteínas para determinar as estruturas secundária, terciária e quaternária é bem conhecido por aqueles habilitados na técnica e foram usados anteriormente para mapear as partes de proteínas que interagem com anticorpos (Padavattan *et al*, 2007; Karpusas *et al* 2001).

Um polipeptídeo isolado ou peptídeo que compreende ou um peptídeo isolado que consiste de, seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 199, podem ser utilizados em métodos de gerar, isolar e/ou testar outros membros de ligação para IL-17A de acordo com a presente invenção.

Conseqüentemente, outros aspectos da invenção dizem respeito a fragmentos isolados da seqüência da IL-17A humana madura SEQ ID NO: 198, os fragmentos compreendendo ou consistindo da seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 199. Os fragmentos por exemplo podem ter até 20, 25, 30, 50 ou 100 aminoácidos de comprimento. Um ou mais fragmentos podem estar contidos dentro de uma seqüência de peptídeo ou polipeptídeo isolada mais longa que não seja uma seqüência de aminoácido da IL-17A, por exemplo, que não seja a IL-17A precursora ou madura por exemplo, não seja a SEQ ID NO: 198. Os peptídeos ou polipeptídeos que compreendem um fragmento ou fragmentos isolados da seqüência de aminoácido da IL-17A podem compreender resíduos de aminoácido adicionais, em que os resíduos adicionais não são contíguos com uma seqüência de aminoácido da IL-17A.

Por exemplo, a SEQ ID NO: 199 pode ser seguida ou precedida por um ou mais resíduos não contíguos com a SEQ ID NO: 198. Membros de ligação, por exemplo, moléculas de anticorpo, para tais polipeptídeos ou peptídeos são aspectos da invenção.

A IL-17A endógena *in vivo* é glicosilada e portanto a IL-17A humana glicosilada é o antígeno terapêutico alvo para a terapia humana. Embora a IL-17A humana recombinante, que pode ser bacterialmente derivada (por exemplo, expressada na *E. coli*) e não glicosilada, possa ser usada em ensaios aqui descritos, foi também demonstrado que os membros de ligação da invenção podem ligar IL-17A humana glicosilada, tal como IL-17A produzida pelas células T humanas ou células EBNA renais embrionárias humanas (HEK). Isto representa uma vantagem significante dos membros de ligação da invenção, visto que a IL-17A humana glicosilada é o antígeno alvo para as aplicações humanas *in vivo*. A afinidade e/ou a potência de membros de ligação da invenção para a IL-17A glicosilada e não glicosilada podem ser as mesmas.

Como descrito em mais detalhes nos Exemplos, os membros de ligação de acordo com a invenção neutraliza IL-17A com alta potência. A neutralização significa a inibição de uma atividade biológica de IL-17A. Os membros de ligação da invenção podem neutralizar uma ou mais atividades de IL-17A. A atividade biológica inibida é tipicamente a ligação de IL-17A a um ou mais de seus parceiros de ligação ou receptores, por exemplo, para IL-17RA.

A neutralização da ligação de IL-17 ao seu receptor pode ser medida como liberação celular de uma molécula biológica por exemplo, MMP13, PGE2 ou uma citocina tal como IL-6 ou IL-8, em um ensaio biológico, visto que a ligação de IL-17A ao seu receptor induz a liberação celular destas moléculas, que pode ser determinada usando ensaios apropriados, por exemplo, em células HT1080 (disponíveis sob ECACC Nº

85111505), condrócitos ou outros tipos de célula ou tecido adequados.

A inibição da atividade biológica pode ser parcial ou total. Em formas de realização específicas, membros de ligação são fornecidos que inibem a atividade biológica de IL-17 em pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80%, pelo menos 75%, pelo menos 70%, pelo menos 60% ou pelo menos 50% da atividade na ausência do membro de ligação. O grau ao qual um membro de ligação neutraliza IL-17A é aludido como a sua potência de neutralização. A potência pode ser determinada ou medida usando um ou mais ensaios conhecidos pela pessoa habilitada e/ou como aqui descrito ou aludido. Por exemplo, potência pode ser ensaiada em:

- Ensaio de ligação de receptor-ligando por HTRF® (Fluorescência Resolvida com o Tempo Homogênea)
- Ensaio de competição de epítopo por HTRF®
- Ensaio de liberação de IL-6 por HT1080
- Ensaio de célula HT1080 usando liberação de IL-6 sinergizada em resposta à IL-17 e TNFα
- Ensaio de liberação de Condrócito IL-6/IL-8/MMP13/PGE2
- Ensaio de liberação de IL-6 em explantes de cartilagem
- Ensaio de liberação de IL-6 em fibroblastos sinoviais (por exemplo, de pacientes RA ou OA), por exemplo, usando a resposta de IL-6 sinergizado para IL-17 e TNFα

Os métodos de ensaio são descritos nos Exemplos.

A potência neutralizadora de um membro de ligação como calculada em um ensaio usando IL-17 de uma primeira espécie (por exemplo, ser humano) pode ser comparada com a potência neutralizadora do membro de ligação no mesmo ensaio usando IL-17 de uma segunda espécie (por exemplo, cinomolgo), de modo a avaliar o grau de reatividade cruzada do membro de ligação para IL-17 das duas espécies.

Membros de ligação da invenção ligam IL-17A humana e IL-

17A de macaco cinomolgo e podem ter uma diferença menor do que 30 vezes, por exemplo, menos do que 25, 20, 15, 10, 5 ou 2 vezes de diferença na potência para neutralizar IL-17A humana e de cinomolgo, por exemplo como determinado em um ensaio de liberação de IL-6 por HT1080.

Por exemplo, os dados aqui indicam que os anticorpos n^{os} 1 a 4 e 7 a 16 têm uma diferença menor do que 20 vezes na potência para neutralizar IL-17A humana e de cinomolgo respectivamente, em um ensaio de liberação de IL-6 em HT1080 aqui descrito. Os dados são apresentados no Exemplo 2. Assim, em algumas formas de realização, a potência de neutralização de membros de ligação da invenção para IL-17A humana e de cinomolgo está dentro de 20 vezes. Em algumas formas de realização a potência de neutralização para IL-17A humana e de cinomolgo é de cerca da mesma ou equipotente, isto é, dentro de 10 vezes.

A potência é normalmente expressada como um valor IC_{50}, em nM a menos que de outro modo estabelecido. Em ensaios funcionais, IC_{50} é a concentração de um membro de ligação que reduz uma resposta biológica em 50% do seu máximo. IC50 pode ser calculada plotando-se a% de resposta biológica máxima como uma função do log da concentração do membro de ligação e usando um programa de software tal como Prism (GraphPad) ou Origin (Origin Labs) para ajustar uma função sigmoidal para os dados para gerar valores IC_{50}.

Um membro de ligação da invenção pode ter uma potência neutralizadora ou IC_{50} de até 15 nM em um ensaio de HTRF® de IL-17A humana como aqui descrito. Este ensaio pode ser usado para determinar a IC_{50} para membros de ligação no formato scFv. A IC_{50} por exemplo pode ser até 10,0, 5,0, 4,0, 3,0, 2,0 ou 1,0 nM. Os exemplos de dados de IC_{50} são apresentados no Exemplo 2 (ver a Tabela 5). Uma concentração final de 0,75 nM de IL-17A humana é usada no ensaio de ligação de receptor-ligando HTRF® e um método detalhado é dado nos exemplos.

Um membro de ligação da invenção pode ter uma potência neutralizadora ou IC_{50} de até 40 nM em um ensaio de liberação de IL-6 de IL-17 humana em HT1080. A IC_{50} pode ser por exemplo até 35, 25, 20, 15, 10 ou 5 nM. Um membro de ligação da invenção pode ter uma potência neutralizadora ou IC_{50} de até 3,0, 2,0 ou 1,0 nM em um ensaio de liberação de IL-6 de IL-17 humana em HT1080. Os exemplos de dados de IC_{50} são apresentados no Exemplo 2 (ver a Tabela 6A). Este ensaio mede a liberação de IL-6 em resposta a 1 nM de IL-17A humana e um método detalhado é dado nos exemplos.

Um membro de ligação da invenção pode ter um valor pA_2 de cerca de ou menor do que 10 em um ensaio de liberação de IL-6 de IL-17 humana em HT1080. Os métodos de análise de pA_2 são descritos na seção de Exemplos. Os dados de exemplo são apresentados no Exemplo 3 (ver a Tabela 8a).

Um membro de ligação da invenção pode ter uma potência neutralizadora ou IC_{50} de não mais do que 1 nM em um ensaio de célula HT1080 que mede a liberação sinergizada de IL-6 em resposta a 125 pM de IL-17A humana e 25 pM de TNFα. Um membro de ligação da invenção pode ter uma potência neutralizadora ou IC_{50} de não mais do que 1, 0,5 ou 0,3 nM neste ensaio. Os exemplos de dados de IC_{50} são apresentados no Exemplo 2 (ver a Tabela 6b).

Um membro de ligação da invenção pode ter um IC_{50} de não mais do que 1 nM, por exemplo, não mais do que 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 nM para a inibição da liberação de IL-6 em células HT1080 estimuladas pela IL-17A glicosilada a partir de células T humanas. Os dados de exemplo são apresentados no Exemplo 2 (Tabela 6c). Estes dados indicam que os anticorpos da invenção ligam e neutralizam IL-17A humana nativa.

Vantajosamente, a alta potência de neutralização pode ser combinada com boa reatividade cruzadas de espécies. Assim, por exemplo,

um membro de ligação pode ter um IC50 de não mais do que 1 nM em um ensaio de liberação de IL-6 HT1080 com IL-17A humana, em que a IC50 no ensaio de IL-17A humana HT1080 não é mais do que 10 vezes diferente da IC50 no ensaio de IL-17A de cinomolgo HT1080. A potência de neutralização para IL-17A humana pode ser maior do que com IL-17A de cinomolgo.

Um membro de ligação da invenção pode ter uma potência neutralizadora de IC_{50} de até 150 nM em um ensaio de liberação de IL-6 de IL-17 de cinomolgo em HT1080, por exemplo, no formato IgG1. A IC_{50} por exemplo pode ser de até 150, 100, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 ou 5 nM. Os exemplos de dados de IC_{50} são apresentados no Exemplo 2 (ver a Tabela 6A). Uma concentração final de 1 nM de IL-17A de cinomolgo é usada no ensaio de liberação de IL-6 em células HT1080 e um método detalhado é dado nos exemplos.

A potência para a inibição da liberação de IL-6, IL-8, MMP13 e/ou PGE2 pode ser determinada em condrócitos primários humanos usando um ensaio como aqui descrito. Os exemplos de dados para os membros de ligação da invenção nestes ensaios são mostrados no Exemplo 4. Um membro de ligação da invenção pode ter um IC_{50} de até 3,0 nM, por exemplo, até 2,0, 1,0, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3 ou 0,2 nM, em um ensaio de liberação de IL-6 de condrócito usando IL-17 a uma concentração de 0,2 nM. Um membro de ligação da invenção pode ter uma IC_{50} de até 20 nM, por exemplo, até 10, 5,0, 4,0, 3,0 ou 2,0 nM em um ensaio de liberação de IL-6 de condrócito usando IL-17 a uma concentração de 2 nM.

Um membro de ligação da invenção pode ter uma IC_{50} de até 3,0 nM, por exemplo, até 2,5, 2,3, 1,0, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 ou 0,1 nM em um ensaio de liberação de IL-8 de condrócito usando IL-17 a uma concentração de 0,2 nM. Um membro de ligação da invenção pode ter uma IC_{50} de até 8 nM, por exemplo, até 5, 4, 3, 2, 1,8, 1,6, 1,5, 1,0 ou 0,8 nM em um ensaio de

liberação de IL-8 de condrócito usando IL-17 a uma concentração de 2 nM.

Um membro de ligação da invenção pode ter uma IC_{50} de até 5 nM, por exemplo, até 4, 3, 2, 1, 0,5 nM em um ensaio de liberação de MMP13 de condrócito usando IL-17 a uma concentração de 0,2 nM. Um membro de ligação da invenção pode ter uma IC_{50} de até 40 nM, por exemplo, até 30, 20, 10, 5 nM, em um ensaio de liberação de MMP13 de condrócito usando IL-17 a uma concentração de 2 nM.

Um membro de ligação da invenção pode ter uma IC_{50} de até 6 nM, por exemplo, até 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 nM em um ensaio de liberação de PGE_2 de condrócito usando IL-17 a uma concentração de 2 nM.

Membros de ligação da invenção podem exibir atividade inibidora, por exemplo, pelo menos 80% ou 90% de inibição ou 100% de inibição, em um ensaio de liberação de IL-6 usando IL-17A a uma concentração de 10 ng/ml em uma resposta sinergizada com TNFα a 1 ng/ml em um ensaio de explante de cartilagem *post mortem*. Um membro de ligação da invenção pode ter uma IC_{50} de não mais do que 5 nM, por exemplo, não mais do que 4, 3, 2, 1, 0,5 nM em um ensaio de liberação de IL-6 em explante de cartilagem *post mortem* usando IL-17A a uma concentração de 10 ng/ml em uma resposta sinergizada com TNFα a 1 ng/ml. Os dados de exemplo são apresentados no Exemplo 6.1 (Tabelas 15a e 15b).

Os membros de ligação da invenção podem exibir atividade inibidora, por exemplo, pelo menos 50, 60 ou 65% de inibição, em um ensaio de sinergia de IL-17/TNFα em fibroblastos sinoviais OA, como aqui descrito (por exemplo, em um ensaio de liberação de IL-8 usando 10 ng/ml ou 1 ng/ml de IL-17 em uma resposta sinergizada com TNFα, onde a resposta máxima tem um componente de IL-17 e TNFα). Os dados de exemplo são apresentados no Exemplo 6.2 (Tabelas 16a e 16b).

Um membro de ligação da invenção pode ter uma IC_{50} de não mais do que 5 nM, por exemplo, não mais do que 4, 3 ou 2 nM em um ensaio

de liberação de IL-8 em fibroblasto de RA sinovial usando IL-17 a uma concentração de 2 nM. Os dados de exemplo são apresentados no Exemplo 6.3 (Tabela 17).

Um membro de ligação da invenção pode ter uma IC_{50} de não mais do que 5 nM, por exemplo, não mais do que 4, 3 ou 2 nM em um ensaio de liberação de IL-8 em fibroblasto de RA sinovial sinergizado com IL-17A mais TNFα usando IL-17 a uma concentração de 1 nM e TNFα a 0,1 ng/ml. Os dados de exemplo são apresentados no Exemplo 6.3 (Tabela 17).

Em um ensaio de bolsa de ar com pré-mistura de camundongo aqui descrito, um membro de ligação da invenção pode inibir a liberação de IL-6 induzida pela IL-17A (pré-misturada com membro de ligação) em pelo menos 25%, por exemplo, pelo menos 30, 35, 40, 45, 50, 55 ou 60%. A inibição pode ser de cerca de 100%. Um membro de ligação por exemplo pode ter um ID_{50} de até 10, por exemplo, até 5, 4, 3, 2 1 ou 0,5 μg neste ensaio. Também no ensaio de bolsa de ar com pré mistura de camundongo aqui descrito, um membro de ligação da invenção pode inibir o influxo induzido por IL-17A de leucócitos em pelo menos 80%, por exemplo, pelo menos 85, 90, 95, 98 ou 99%. A inibição pode ser de cerca de 100%. Um membro de ligação por exemplo pode ter um ID_{50} de até 5, 4, 3, 2 ou 1 μg neste ensaio. Os dados do exemplo para um membro de ligação da invenção com conjuntos de Anticorpo 2 e Anticorpo 7 de CDRs são apresentados no Exemplo 5 (ver a Tabela 13a e Tabela 14a).

Em um ensaio de bolsa de ar de camundongo sistemicamente dosado aqui descrito, um membro de ligação da invenção pode inibir a liberação de IL-6 induzida pela IL-17A (membro de ligação sistemicamente dosado seguido pela IL-17A administrada à bolsa de ar) em pelo menos 70%, por exemplo, pelo menos 75, 80 ou 85%. Um membro de ligação por exemplo pode ter um ID_{50} de até 1 μg por exemplo, até 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1 ou 0,05 μg neste ensaio. Também no ensaio de bolsa de ar sistemicamente dosado de

camundongo aqui descrito, um membro de ligação da invenção pode inibir o influxo induzido pela IL-17A de leucócitos em pelo menos 70%, por exemplo, pelo menos 75, 80, 85, 90 ou 95%. A inibição pode ser de cerca de 100%. Um membro de ligação por exemplo pode ter uma ID_{50} de até 2, por exemplo, até 1,5, 1, 0,9, 0,8, 0,7 ou 0,6 μg neste ensaio. Os dados de exemplo para um membro de ligação da invenção com o conjunto de anticorpo 7 de CDRs são apresentados no Exemplo 5 (ver a Tabela 13b e Tabela 14b).

Os dados obtidos no ensaio de bolsa de ar como descrito no Exemplo 5 demonstra a capacidade de um membro de ligação para inibir respostas induzidas pela IL-17A quando administrado local ou sistemicamente. Os dados indicam que a administração de um membro de ligação da invenção é eficaz para tratar distúrbios associados com IL-17A em sítios localizados de inflamação e assim são úteis para o tratamento de distúrbios tais como artrite reumatóide através da inibição de respostas induzidas pela IL-17A na junta sinovial. É digno de nota que a administração sistêmica de um membro de ligação da invenção mostrasse ser eficaz para inibir efeitos de IL-17A e que a administração local não fosse requerida para a inibição eficaz. Isto é de vantagem particular para o uso clínico de membros de ligação, por exemplo, no ser humano, onde a administração sistêmica pode ser usada e onde o sítio de administração é freqüentemente separado do sítio ou sítios onde o distúrbio é manifestado, por exemplo, sítio ou sítios de inflamação tais como a junta sinovial.

Adicionalmente, as cinéticas e afinidades de ligação (expressadas como a constante de dissociação de equilíbrio, Kd) de membros de ligação de IL-17A a IL-17A podem ser determinadas, por exemplo, usando ressonância de plasma de superfície tal como BIAcore ou Kd podem ser estimadas a partir da análise de pA_2.

Um membro de ligação da invenção por exemplo pode ter um Kd para IL-17A humana de menos do que 1000 pM, por exemplo, menos do

que 600, 500, 400, 300 ou 200 pM como calculada a partir da análise pA_2 no ensaio de liberação de IL-17 humano de IL-6 em HT1080.

Como em outro lugar aqui descrito, a ressonância de plasma de superfície envolve passar um analito na fase fluídica em um ligando ligado a um suporte e determinar a ligação entre o analito e o ligando. A ressonância de plasma de superfície por exemplo pode ser realizada pelo qual IL-17A é passada na fase fluida em um membro de ligação ligado a um suporte. Os dados de ressonância de plasma de superfície podem ser ajustado a um modelo de dados de analito bivalente ou um modelo de doados de analito monovalente. Como mostrado nos Exemplos aqui, um modelo de dados de analito bivalente foi verificado ser particularmente apropriado para determinar a afinidade de membros de ligação para IL-17. Uma constante de afinidade Kd pode ser calculada a partir da razão de constantes de taxa kd1/ka1 como determinadas pela ressonância de plasma de superfície usando um modelo de dados de analito bivalente.

Os exemplos de valores KD estimados para a ligação de IL-17 calculada usando ressonância de plasma de superfície são apresentados no Exemplo 3 (ver a Tabela 8b). Estes dados demonstram boas propriedades de ligação de Anticorpo 7 para IL-17A humana recombinantemente produzida pela expressão na *E. coli* ou em células HEK EBNA. A ligação a IL-17A de células HEK EBNA demonstra que o anticorpo liga IL-17A humana glicosilada nativa. A ligação pelo Anticorpo 7 da forma glicosilada nativa indica que todos os Anticorpos 1 a 16 são capazes de ligar IL-17A humana glicosilada nativa, dado que todos estes anticorpos foram derivados de um único anticorpo precursor (Anticorpo 1) e assim acredita-se que todos liguem o mesmo epítopo de IL-17A ou um altamente similar.

Um membro de ligação da invenção pode ter menos do que 5 vezes, por exemplo, menos do que 2,5 vezes ou menos do que 2 vezes, diferença na afinidade quanto a ligação da IL-17A humana expressada em

células humanas (por exemplo, IL-17A derivada de HEK EBNA) do que para a ligação de IL-17A humana expressada em células bacterianas (por exemplo, IL-17A derivada por *E. coli*).

Um membro de ligação da invenção pode ter um Kd para IL-17A humana de cerca de ou menos do que 2,5 nM, calculada a partir da razão de constantes de taxa kd1/ka1 como determinada pela ressonância de plasma de superfície usando um modelo de dados de analito bivalente.

Por exemplo, um membro de ligação da invenção pode ter um Kd para IL-17A humana de menos do que 2,5 nM, 2 nM, 1,5 nM, 1,0 nM ou 0,5 nM calculada a partir da razão de constantes de taxa kd1/ka1 como determinadas usando ressonância de plasma de superfície, usando um modelo de dados de analito bivalente.

Um membro de ligação da invenção pode ter uma afinidade para IL-17A humana de cerca de ou menos do que 0,3 nM, como determinada pela ressonância de plasma de superfície usando um modelo de dados de analito monovalente. Um membro de ligação da invenção por exemplo pode ter um Kd para IL-17A humana de menos do que 300 pM, por exemplo, menos do que 200 pM, como calculada usando ressonância de plasma de superfície usando um modelo de dados monovalente.

Um membro de ligação da invenção pode ter um Kd para a IL-17A de cinomolgo de cerca de ou menos do que 1,5 nM calculada a partir da razão de constantes de taxa kd1/ka1 como determinadas pela ressonância de plasma de superfície usando um modelo de dados de analito bivalente.

Membros de ligação da invenção podem ter uma diferença de menos do que 10 vezes na afinidade para a IL-17A humana e de cinomolgo, por exemplo, como determinada usando a ressonância de plasma de superfície, usando um modelo monovalente ou bivalente para ajustar os dados. Assim, um membro de ligação da invenção pode ligar IL-17A de cinomolgo com um Kd de menos do que 10 vezes de diferença do que para a

ligação de IL-17A humana, por exemplo, menos do que 5 vezes ou menos do que 3 vezes de diferença, como determinado usando a ressonância de plasma de superfície. Como mencionado em outro lugar aqui, a afinidade pode ser Kd calculada da razão de constantes de taxa kd1/ka1 como determinado pela ressonância de plasma de superfície usando um modelo de dados de analito bivalente.

Como ilustrado no Exemplo 3 e Tabela 8b, uma boa reatividade cruzada na ligação de IL-17A humana e de cinomolgo foi determinada para o Anticorpo 7.

Os dados de reatividade cruzada obtidos para o Anticorpo 7 podem ser interpretados como sendo representativos da reatividade cruzada para todos os Anticorpos de 1 a 16, dado que todos estes anticorpos foram derivados de um único anticorpo precursor (Anticorpo 1) e são assim acreditados para todas as ligações do mesmo epítopo ou um altamente similar de IL-17.

Os dados aqui relatados indicam que os membros de ligação da invenção não são reativos cruzados com homólogos de IL-17, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E ou IL-17F. A ligação fraca é observada com IL-17F em alguns casos. A reatividade cruzada pode ser determinada por exemplo medindo-se o grau de inibição por um homólogo de IL-17 da ligação de IL-17A a um membro de ligação da invenção, por exemplo, usando um ensaio de competição de epítopo de HTRF® como aqui descrito. Como aqui descrito, os homólogos de IL-17 de B a E não inibem significantemente a ligação de IL-17A aos membros de ligação da invenção em um tal ensaio, demonstrando que os membros de ligação não são reativos cruzados com os homólogos de IL-17 de B a E.

Um membro de ligação da invenção pode mostrar inibição parcial (isto é, menor do que 100%) da ligação a IL-17A em um ensaio de competição de epítopo com IL-17F, por exemplo, em que IL-17F está a uma

concentração de 1 μM ou mais. Por exemplo, a IL-17F pode inibir a ligação à IL-17A em não mais do que 50%, por exemplo, não mais do que cerca de 20%.

Nenhuma de IL-17B, C, D e nem F pode ser capaz de inibir completamente a ligação de um membro de ligação à IL-17A humana. A ligação de um membro de ligação da invenção à IL-17A humana pode não ser completamente inibida por 1 μM de qualquer um de IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E ou IL-17F (individualmente) em um ensaio de competição de epítopo. Assim, a ligação do membro de ligação para IL-17A humana pode não ser inibida em mais do que 50%, por exemplo, não mais do que 20%, por 1 μM de qualquer um de IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E ou IL-17F em um ensaio de competição de epítopo usando IL-17A rotulada a uma concentração igual à constante de dissociação Kd da interação do membro de ligação com IL-17A humana, em que a dita Kd é calculada a partir da razão de constantes de taxa kd1/ka1 como determinado pela ressonância de plasma de superfície, por exemplo, BIAcore, usando um modelo de dados de analito bivalente. A ligação do membro de ligação à IL-17A humana em um tal ensaio de competição de epítopo por exemplo pode não ser inibida por 1 μM de qualquer um de IL-17B, IL-17C, IL-17D ou IL-17E e pode não ser inibida ou pode ser inibida mas em menos do que 50%, por 1 μM de IL-17F.

Os dados de exemplo no ensaio de competição de epítopo são apresentados no Exemplo 2.7 (ver a Tabela 7). Os valores IC50 podem não ser determinados em um ensaio de competição de epítopo com IL-17B, C, D e ou F, indicando que os valores IC50 foram muito altos para serem mensuráveis neste ensaio.

A reatividade cruzada limitada com homólogos de IL-17 exibida pelos membros de ligação da invenção oferecem uma vantagem quanto a seu uso terapêutico e/ou de diagnóstico, particularmente em aplicações *in vivo* onde é desejável inibir especificamente IL-17A. Os efeitos

colaterais causados pela reatividade cruzada não desejável são reduzidos. Além disso, concentrações mais baixas de membro de ligação podem ser usadas, visto que a reatividade cruzada limitada significa que mais de uma dose administrada de membro de ligação está disponível para alvejar a ligação de IL-17A. Isto representa uma vantagem particular na dosagem para aplicações terapêuticas *in vivo*.

Um membro de ligação da invenção pode compreender uma molécula de anticorpo, por exemplo, uma molécula de anticorpo humana. O membro de ligação normalmente compreende um domínio de anticorpo VH e/ou VL. Os domínios VH de membros de ligação são também fornecidos como parte da invenção. Dentro de cada um dos domínios VH e VL estão as regiões determinadoras de complementaridade, ("CDRs") e regiões de matriz, ("FRs"). Um domínio VH compreende um conjunto de HCDRs e um domínio VL compreende um conjunto de LCDRs. Uma molécula de anticorpo pode compreender um domínio VH de anticorpo que compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 de VH e uma matriz. A mesma alternativamente ou também pode compreender um domínio VL de anticorpo que compreende uma CDR1, CDR2 e CDR3 de VL e uma matriz. Uma matriz de domínio VH ou VL compreende quatro regiões de matriz, FR1, FR2, FR3 e FR4, intercaladas com CDRs na seguinte estrutura:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4.

Os exemplos de domínios VH e VL de anticorpo, FRs e CDRs de acordo com a presente invenção são como listados na listagem de seqüência anexa que forma parte da presente divulgação. Outras CDRs exemplares são divulgadas abaixo e na Tabela 21. Todas as seqüências VH e VL, seqüências CDR, conjuntos de CDRs e conjuntos de HCDRs e conjuntos de LCDRs aqui divulgados representam aspectos e formas de realização da invenção. Como aqui descrito, um "conjunto de CDRs" compreende CDR1, CDR2 e CDR3. Assim, um conjunto de HCDRs refere-se a HCDR1, HCDR2

e HCDR3 e um conjunto de LCDRs refere-se a LCDR1, LCDR2 e LCDR3. A menos que de outro modo estabelecido, um "conjunto de CDRs" inclui HCDRs e LCDRs. Tipicamente membros de ligação da invenção são anticorpos monoclonais.

Um outro aspecto da invenção é uma molécula de anticorpo que compreende um domínio VH que tem pelo menos 80, 85, 90, 95, 98 ou 99% de identidade de seqüência de aminoácido com um domínio VH de qualquer um dos anticorpos de 1 a 16 mostrados na listagem de seqüência anexa e/ou que compreende um domínio VL que tem pelo menos 80, 85, 90, 95, 98 ou 99% de identidade de seqüência de aminoácido com um domínio VL de qualquer um dos anticorpos de 1 a 16 mostrados na listagem de seqüência anexa. Algoritmos que podem ser usados para calcular a% de identidade de duas seqüências de aminoácido incluem por exemplo, BLAST (Altschul *et al.* 1990), FASTA (Pearson & Lipman 1988) ou o algoritmo de Smith-Waterman (Smith & Waterman 1981), por exemplo, utilizando parâmetros de default.

Um membro de ligação da invenção pode compreender um sítio de ligação de antígeno dentro de uma molécula que não de anticorpo, normalmente fornecida por uma ou mais CDRs por exemplo, uma HCDR3 e/ou LCDR3 ou um conjunto de CDRs, em um esqueleto de proteína que não anticorpo, como debatido mais abaixo.

Como descrito em mais detalhes na Parte Experimental, foi isolada uma molécula de anticorpo precursora (anticorpo nº 1) com um conjunto de seqüências de CDR como mostrado na Tabela 21. Através de um processo de otimização foi gerado um painel de clones de anticorpo numerados de 2 a 16, com seqüências de CDR3 derivadas das seqüências de CDR3 precursoras e tendo substituições nas posições indicadas na Tabela 21. Assim por exemplo pode ser observado a partir da Tabela 21 que o Anticorpo 2 tem as seqüências HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1 e LCDR2

precursoras e tem uma seqüência de LCDR3 precursora em que os resíduos Kabat 93 e 94 são substituídos com P e H, respectivamente. A molécula de anticorpo precursora e moléculas de anticorpo de 2 a 16, como aqui descritas referem-se respectivamente às moléculas de anticorpo com CDRs da molécula de anticorpo precursora e às moléculas de anticorpo com CDRs das moléculas de anticorpo de 2 a 16.

É aqui descrito um membro de ligação que compreende o conjunto de CDRs precursor como mostrado na Tabela 21, em que HCDR1 é a SEQ ID NO: 3 (os resíduos Kabat de 31 a 35), HCDR2 é a SEQ ID NO: 4 (os resíduos Kabat de 50 a 65), HCDR3 é a SEQ ID NO: 5 (os resíduos Kabat de 95 a 102), LCDR1 é a SEQ ID NO: 8 (os resíduos Kabat de 24 a 34), LCDR2 é a SEQ ID NO: 9 (os resíduos Kabat de 50 a 56) e LCDR3 é a SEQ ID NO: 10 (os resíduos Kabat 89-97).

Um membro de ligação da invenção pode compreender uma ou mais CDRs como aqui descritas, por exemplo, uma CDR3 e opcionalmente também uma CDR1 e CDR2 para formar um conjunto de CDRs. A CDR ou conjunto de CDRs podem ser uma CDR precursora ou conjunto de CDRs precursoras ou podem ser uma CDR ou conjunto de CDRs de qualquer um dos anticorpos de 2 a 16 ou podem ser uma variante destas como aqui descrito.

Por exemplo, um membro de ligação ou um domínio VL de acordo com a invenção pode compreender a LCDR3 precursora com os resíduos Kabat 93 e 94 substituídos por P e H, respectivamente.

Um membro de ligação ou um domínio VH pode compreender a HCDR3 precursora com uma ou mais das seguintes substituições:

o resíduo Kabat 98 substituído por F ou H;

o resíduo Kabat 100A substituído por G ou T;

o resíduo Kabat 101 substituído por R;

o resíduo Kabat 102 substituído por G ou N.

Um membro de ligação ou um domínio VL deste podem compreender a LCDR3 precursora com uma ou mais das seguintes substituições:

o resíduo Kabat 90 substituído por T;

o resíduo Kabat 92 substituído por N ou S;

o resíduo Kabat 93 substituído por H ou P;

o resíduo Kabat 94 substituído por H, K, R, T ou Y;

o resíduo Kabat 95 substituído por D, N ou V;

o resíduo Kabat 96 substituído por I ou Q.

A substituição de D na posição Kabat 93 em LCDR3 com P é associada com maior potência de um membro de ligação contra IL-17A humana e/ou de cinomolgo.

Os membros de ligação da invenção podem compreender uma HCDR1, HCDR2 e/ou HCDR3 de qualquer um dos anticorpos de 1 a 16 e/ou uma LCDR1, LCDR2 e/ou LCDR3 de qualquer um dos anticorpos de 1 a 16, por exemplo, um conjunto de CDRs de qualquer um dos anticorpos de 1 a 16 mostrado na Tabela 21. Um membro de ligação pode compreender um conjunto de VH CDRs de um destes anticorpos. Opcionalmente o mesmo também pode compreender um conjunto de CDRs VL de um destes anticorpos e as CDRs VL podem ser do mesmo ou de um anticorpo diferente como as CDRs VH. Um domínio VH que compreende um conjunto de HCDRs de qualquer um dos anticorpos de 1 a 16 e/ou um domínio VL que compreende um conjunto de LCDRs de qualquer um dos anticorpos de 1 a 16, são também formas de realização individuais da invenção.

Tipicamente, um domínio VH é emparelhado com um domínio VL para fornecer um sítio de ligação de antígeno de anticorpo, embora como debatido mais abaixo um domínio VH ou VL sozinhos podem ser usados para ligar antígeno. Em uma forma de realização, o anticorpo 1 domínio VH é emparelhado com o anticorpo 1 domínio VL, de modo que um sítio de ligação

de antígeno de anticorpo seja formado compreendendo tanto o domínio VH quanto o VL do anticorpo 1. Formas de realização análogas são fornecidas para os outros domínios VH e VL aqui divulgados. Em outras formas de realização, o anticorpo 1 VH é emparelhado com um domínio VL outro que não o VL do anticorpo 1. A promiscuidade de cadeia leve é bem estabelecida na técnica. Mais uma vez, formas de realização análogas são fornecidas pela invenção para os outros domínios VH e VL aqui divulgados. Assim, o VH do precursor ou de qualquer um dos anticorpos de 2 a 16 pode ser emparelhado com o VL do precursor ou de qualquer um dos anticorpos de 2 a 16.

Um aspecto da invenção é uma molécula de anticorpo isolada que compreende um domínio VH com a seqüência de aminoácido do domínio VH mostrado na SEQ ID NO: 62 e um domínio VL com a seqüência de aminoácido do domínio VL mostrado na SEQ ID NO: 67 ou SEQ ID NO: 176.

Um membro de ligação pode compreender um conjunto de CDRs H e/ou L do anticorpo precursor ou qualquer um dos anticorpos de 2 a 16 com dez ou nove ou menos, por exemplo, um, dois, três, quatro ou cinco, substituições dentro do conjunto divulgado de CDRs H e/ou L. Por exemplo, um membro de ligação da invenção pode compreender o conjunto de anticorpo 7 de CDRs H e/ou L com 10 ou menos substituições, por exemplo, cinco ou menos substituições, por exemplo, zero, uma ou duas substituições. As substituições podem ser potencialmente fabricadas em qualquer resíduo dentro do conjunto de CDRs e pode estar dentro da CDR1, CDR2 e/ou CDR3.

As substituições podem estar dentro da CDR3, por exemplo, nas posições substituídas em qualquer um dos Anticorpos de 2 a 16, como mostrado na Tabela 21. Assim, a uma ou mais substituições podem compreender uma ou mais substituições nos seguintes resíduos:

o resíduo Kabat 98, 100A, 101 ou 102 na HCDR3; ou

o resíduo Kabat 90, 92, 93, 94, 95 ou 96 na LCDR3.

Assim, uma CDR3 por exemplo pode ser uma LCDR3 precursora (Anticorpo 1) tendo uma substituição no resíduo Kabat 93 e/ou 94.

Os exemplos de substituições nas CDRs precursoras são descritas aqui em outro lugar. Como descrito, as substituições podem compreender uma ou mais substituições como mostrado na Tabela 21.

Um membro de ligação da invenção pode compreender uma HCDR1, HCDR2 e/ou HCDR3 como segue:

HCDR1 em que o resíduo Kabat 31 é Ser, Ala, Gly, Thr ou Cys por exemplo, Ser e/ou o resíduo Kabat 32 é Tyr;

HCDR2 em que o resíduo Kabat 58 é Tyr ou Phe, por exemplo, Tyr;

HCDR3 em que o resíduo Kabat 96 é um resíduo hidrofóbico, isto é, um resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral não polar, por exemplo Leu, Ile, Val, Ala ou Phe, por exemplo, Leu,

o resíduo Kabat 97 é um resíduo hidrofóbico, por exemplo, Ile, Leu, Val, Ala ou Phe, por exemplo, Ile, e/ou

o resíduo Kabat 98 é resíduo cíclico, i.e. um resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral que compreende uma porção cíclica.

Por exemplo, o resíduo Kabat 98 pode ser His, Trp ou Phe, por exemplo, His ou Trp, por exemplo, His.

Como indicado no Exemplo 7.4, os resíduos nestas posições de HCDR podem ligar IL-17A.

Um membro de ligação da invenção pode compreender uma LCDR1 e/ou LCDR3 como segue:

LCDR1 em que o resíduo Kabat 31 é Tyr ou Phe, por exemplo, Tyr e/ou o resíduo Kabat 32 é Tyr ou Phe, por exemplo, Tyr;

LCDR3 em que o resíduo Kabat 91 é Tyr e/ou o resíduo Kabat 93 é Pro, hidroxiprolina, His, metilistidina ou Asp, por exemplo, Pro ou His, por exemplo, Pro.

Opcionalmente, o resíduo Kabat 29 em LCDR1 é Ala e/ou o resíduo Kabat 30 em LCDR1 é Asn.

Opcionalmente, um membro de ligação da invenção pode compreender uma LCDR2 em que o resíduo Kabat 53 é um resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral polar não carregada, por exemplo, Gln.

Como indicado no Exemplo 7.4, os resíduos nestas posições de LCDR podem ligar IL-17A.

Por exemplo, um membro de ligação da invenção pode compreender um conjunto de CDRs: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3, que compreende 7 ou mais, por exemplo, 8, 9 ou todos dos seguintes resíduos:

- Ser, Ala, Gly, Thr ou Cys, por exemplo, Ser, no resíduo Kabat 31 de HCDR1;

- Tyr no resíduo Kabat 32 de HCDR1;

- Tyr ou Phe, por exemplo, Tyr, no resíduo Kabat 58 de HCDR2;

- um resíduo hidrofóbico, por exemplo, Leu, Ile, Val, Ala ou Phe, por exemplo, Leu, no resíduo Kabat 96;

- um resíduo hidrofóbico, por exemplo, Ile, Leu, Val, Ala ou Phe, por exemplo, Ile, no resíduo Kabat 97 de HCDR3;

- um resíduo cíclico por exemplo, His, Trp ou Phe, por exemplo, His ou Trp, por exemplo, His, no resíduo Kabat 98 de HCDR3;

- Tyr ou Phe, por exemplo, Tyr, no resíduo Kabat 31 de LCDR1;

- Tyr ou Phe, por exemplo, Tyr, no resíduo Kabat 32 de LCDR1;

- Tyr no resíduo Kabat 91 de LCDR3; e

- Pro, hidroxiprolina, His ou 3-metilistidina, por exemplo, Pro ou His, por exemplo, Pro, no resíduo Kabat 93 de LCDR3.

O membro de ligação pode compreender um conjunto de CDRs em que:

o resíduo Kabat 31 de HCDR1 é Ser;

o resíduo Kabat 32 de HCDR1 é Tyr;

o resíduo Kabat 58 de HCDR2 é Tyr;

o resíduo Kabat 96 de HCDR3 é Leu;

o resíduo Kabat 97 de HCDR3 é Ile;

o resíduo Kabat 98 de HCDR3 é His;

o resíduo Kabat 31 de LCDR1 é Tyr;

o resíduo Kabat 32 de LCDR1 é Tyr;

o resíduo Kabat 91 de LCDR3 é Tyr; e

o resíduo Kabat 93 de LCDR3 é Pro.

Em um membro de ligação da invenção:

HCDR1 pode ter 5 aminoácidos de comprimento, que consiste dos resíduos Kabat de 31 a 35;

HCDR2 pode ter 17 aminoácidos de comprimento, que consiste dos resíduos Kabat de 50 a 65;

HCDR3 pode ter 9 aminoácidos de comprimento, que consiste dos resíduos Kabat de 95 a 102;

LCDR1 pode ter 13 aminoácidos de comprimento, que consiste dos resíduos Kabat de 24 a 34;

LCDR2 pode ter 7 aminoácidos de comprimento, que consiste dos resíduos Kabat de 50 a 56; e/ou

LCDR3 pode ter 9 aminoácidos de comprimento, que consiste dos resíduos Kabat de 89 a 97.

A numeração Kabat de um conjunto de HCDRs e LCDRs, em que HCDR1 tem os resíduos Kabat de 31 a 35, HCDR2 tem os resíduos Kabat de 50 a 65, HCDR3 tem os resíduos Kabat de 95 a 102, LCDR1 tem os resíduos Kabat de 24 a 34, LCDR2 tem os resíduos Kabat de 50 a 56 e

LCDR3 tem os resíduos Kabat de 89 a 97, é exemplificada na Tabela 21.

Um membro de ligação pode compreender uma molécula de anticorpo tendo uma ou mais CDRs, por exemplo, um conjunto de CDRs, dentro de uma matriz de anticorpo. Por exemplo, uma ou mais CDRs ou um conjunto de CDRs de um anticorpo podem ser enxertados em uma matriz (por exemplo, matriz humana) para fornecer uma molécula de anticorpo. As regiões de matriz podem compreender seqüências de segmento de gene da linha germinativa humana. Assim, a matriz pode ser da linha germinativa, por meio da qual um ou mais resíduos dentro da matriz são mudados para emparelhar os resíduos na posição equivalente na maior parte da matriz da linha germinativa humana similar. A pessoa habilitada pode selecionar um segmento da linha germinativa que é mais próxima na seqüência à seqüência da matriz do anticorpo antes de formar a linha germinativa e testar a afinidade ou atividade dos anticorpos para confirmar que a formação da linha germinativa não reduz significantemente a ligação de antígeno ou potência nos ensaios aqui descritos. As seqüências de segmento de gene da linha germinativa humana são conhecidas por aqueles habilitados na técnica e podem ser acessados por exemplo da compilação de VBase.

Em uma forma de realização, um membro de ligação da invenção é uma molécula de anticorpo humana isolada tendo um domínio VH que compreende um conjunto de HCDRs em uma matriz da linha germinativa humana, por exemplo, VH3-23. Assim, as regiões de matriz do domínio VH, FR1, FR2 e/ou FR3 podem compreender regiões de matriz do segmento de gene da linha germinativa humana VH3-23. FR4 pode compreender uma região de matriz do segmento j da linha germinativa humana JH1, JH4 ou JH5 (estes segmentos j têm seqüências de aminoácido idênticas) ou pode compreender uma região de matriz do segmento j da linha germinativa humano JH3. A seqüência de aminoácido de VH FR1 pode ser a SEQ ID NO: 189. A seqüência de aminoácido de VH FR2 pode ser a SEQ ID NO: 190. A

seqüência de aminoácido de VH FR3 pode ser a SEQ ID NO: 191. A seqüência de aminoácido de VH FR4 pode ser a SEQ ID NO: 192. Normalmente o membro de ligação também tem um domínio VL que compreende um conjunto de LCDRs, por exemplo, em uma matriz da linha germinativa humana, por exemplo, Vλ6a. Assim, as regiões de matriz do domínio VL, FR1, FR2 e/ou FR3 podem compreender regiões de matriz do segmento de gene da linha germinativa humana Vλ6a. FR4 pode compreender uma região de matriz do segmento j da linha germinativa humana JL2 ou JL3 (estes segmentos j têm seqüências de aminoácido idênticas). A seqüência de aminoácido de VL FR1 pode ser a SEQ ID NO: 193. A seqüência de aminoácido de VL FR2 pode ser a SEQ ID NO: 194. A seqüência de aminoácido de VL FR3 pode ser a SEQ ID NO: 195. A seqüência de aminoácido de VL FR4 pode ser a SEQ ID NO: 196. Um domínio VH ou VL da linha germinativa pode ser ou não da linha germinativa em um ou mais resíduos Vernier, mas normalmente não é.

Uma molécula de anticorpo ou domínio VH da invenção pode compreender um VH FR1 em que o resíduo Kabat 28 é Thr ou Ser, por exemplo, Thr e/ou o resíduo Kabat 30 é Ser ou Thr, por exemplo, Ser.

Uma molécula de anticorpo ou domínio VL da invenção pode compreender um VL FR2 em que o resíduo Kabat 49 é um resíduo hidrofóbico por exemplo, Phe, Tyr ou His, por exemplo, Phe.

Como indicado no Exemplo 7.4, Thr28 e Ser30 na matriz do domínio VH e Phe49 na matriz do domínio VL pode ligar IL-17A.

Uma molécula de anticorpo ou um domínio VH da invenção pode compreender o seguinte conjunto das regiões de matriz de cadeia pesada:

FR1 SEQ ID NO: 189;

FR2 SEQ ID NO: 190;

FR3 SEQ ID NO: 191;

FR4 SEQ ID NO: 192;

ou pode compreender o dito conjunto das regiões de matriz de cadeia pesada com um, dois, três, quatro ou cinco alterações de aminoácido, por exemplo, substituições.

Uma molécula de anticorpo ou um domínio VL da invenção pode compreender o seguinte conjunto das regiões de matriz de cadeia leve:

FR1 SEQ ID NO: 193;

FR2 SEQ ID NO: 194;

FR3 SEQ ID NO: 195;

FR4 SEQ ID NO: 196;

ou pode compreender o dito conjunto das regiões de matriz de cadeia leve com uma, duas, três, quatro ou cinco alterações de aminoácido, por exemplo, substituições.

Uma alteração de aminoácido pode ser uma substituição, uma inserção ou uma deleção. As alterações opcionalmente não são feitas no resíduo Kabat Thr28 na VH FR1, o resíduo Kabat Ser30 na VH FR1 e/ou o resíduo Kabat Phe49 na VL FR2.

Por exemplo, uma molécula de anticorpo da invenção pode compreender um conjunto das regiões de matriz de cadeia pesada e leve, em que

A FR1 de cadeia pesada é a SEQ ID NO: 189;

A FR2 de cadeia pesada é a SEQ ID NO: 190;

A FR3 de cadeia pesada é a SEQ ID NO: 191;

A FR4 de cadeia pesada é a SEQ ID NO: 192;

A FR1 de cadeia leve é a SEQ ID NO: 193;

A FR2 de cadeia leve é a SEQ ID NO: 194;

A FR3 de cadeia leve é a SEQ ID NO: 195;

A FR4 de cadeia leve é a SEQ ID NO: 196;

ou pode compreender o dito conjunto de regiões de matriz de

cadeia pesada e leve com 10 ou menos, por exemplo, cinco ou menos, alterações de aminoácido, por exemplo, substituições. Por exemplo pode haver uma ou duas substituições de aminoácido no dito conjunto das regiões de matriz de cadeia pesada e leve.

Um anticorpo da linha não germinativa tem as mesmas CDRs, mas matrizes diferentes, comparado com um anticorpo da linha germinativa.

Das seqüências de anticorpo aqui mostradas, os domínios VH dos anticorpos 2, 4, 5, 6, 7, 13, 14 e 15 são da linha germinativa, os domínios VH de anticorpos 1, 8, 9, 10, 11, 12 e 16 não são da linha germinativa, os domínios VL dos anticorpos 2 e 7 são da linha germinativa e os domínios VL dos anticorpos 1, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 não são da linha germinativa.

Um membro de ligação da presente invenção pode ser um que compete para a ligação ao IL-17 com qualquer membro de ligação que liga tanto IL-17 quanto compreende um membro de ligação, domínio VH e/ou VL, CDR por exemplo, HCDR3 e/ou conjuntos de CDR aqui divulgados. A competição entre membros de ligação pode ser facilmente avaliada *in vitro*, por exemplo usando ELISA e/ou pela rotulação de uma molécula repórter específica a um membro de ligação que pode ser detectada na presença de um ou mais outros membros de ligação não rotulados, para permitir a identificação de membros de ligação que ligam o mesmo epítopo ou um epítopo de sobreposição. A competição pode ser determinada por exemplo usando ELISA em que IL-17 é imobilizada em uma placa e um primeiro membro de ligação rotulado junto com um ou mais outros membros de ligação não rotulados são adicionados à placa. A presença de um membro de ligação não rotulado que compete com o membro de ligação rotulado é observado por uma diminuição no sinal emitido pelo membro de ligação rotulado. Tais métodos são facilmente conhecidos por uma pessoa de habilidade comum na técnica e são descritos em mais detalhes aqui. Em uma

forma de realização, a ligação competitiva é ensaiada usando um ensaio de competição de epítopo como aqui descrito. Um membro de ligação da presente invenção pode compreender um sítio de ligação de antígeno de anticorpo que compete com uma molécula de anticorpo, por exemplo especialmente uma molécula de anticorpo que compreende um domínio VH e/ou VL, CDR por exemplo, HCDR3 ou conjunto de CDRs do anticorpo precursor ou qualquer um dos anticorpos de 1 a 16 para a ligação à IL-17. Os aspectos da invenção fornecem membros de ligação que competem para a ligação à IL-17 com qualquer membro de ligação aqui definido, por exemplo, compete com o anticorpo precursor ou qualquer um dos anticorpos de 2 a 16, por exemplo, no formato scFv ou IgG1. Um membro de ligação que compete quanto a ligação à IL-17 com qualquer membro de ligação aqui definido pode ter qualquer uma ou mais das propriedades estruturais e/ou funcionais aqui divulgadas para os membros de ligação da invenção.

Em outros aspectos, a invenção fornece um ácido nucleico isolado que compreende uma seqüência que codifica um membro de ligação, domínio VH e/ou domínio VL de acordo com a presente invenção e métodos de preparar um membro de ligação, um domínio VH e/ou um domínio VL da invenção, que compreende expressar o dito ácido nucleico sob condições para realizar a produção do dito membro de ligação, domínio VH e/ou domínio VL e recuperá-la.

Um outro aspecto da presente invenção fornece ácido nucleico, no geral isolado, que codifica uma seqüência VH CDR ou VL CDR aqui divulgada.

Um outro aspecto fornece uma célula hospedeira contendo ou transformada com o ácido nucleico da invenção.

Outros aspectos da presente invenção fornecem composições contendo membros de ligação da invenção e seu uso em métodos de inibir e/ou neutralizar IL-17, incluindo métodos de tratamento do corpo humano ou

animal pela terapia.

Os membros de ligação de acordo com a invenção podem ser usados em um método de tratamento ou diagnóstico do corpo humano ou animal, tal como um método de tratamento (que pode incluir tratamento profilático) de uma doença ou distúrbio em um paciente humano que compreende administrar ao dito paciente uma quantidade eficaz de um membro de ligação da invenção. As condições tratáveis de acordo com a presente invenção incluem qualquer uma em que a IL-17 desempenha um papel, como debatido em detalhes aqui em outro lugar.

Estes e outros aspectos da invenção são descrito em mais detalhes abaixo.

Terminologia

É conveniente salientar aqui que "e/ou" onde aqui usado deve ser interpretado como divulgação específica de cada uma das duas características ou componentes especificados com ou sem o outro. Por exemplo "A e/ou B" deve ser interpretado como a divulgação específica de cada um de (i) A, (ii) B e (iii) A e B, exatamente como se cada um fosse individualmente aqui apresentado.

IL-17

IL-17 ou IL-17A, são interleucina-17. Referências a IL-17 são normalmente a IL-17A humana a menos que de outro modo indicado.

IL-17A é expressada *in vivo* com um peptídeo de sinal de terminal N de 23 aminoácidos, que é clivado para produzir IL-17^A madura. Uma seqüência de IL-17A humana madura do tipo selvagem é a SEQ ID NO: 198.

É convencional referir-se aos resíduos de aminoácido em IL-17 de acordo com a numeração de resíduo da seqüência madura, sem o peptídeo de sinal. A numeração de resíduo de IL-17 humano refere-se aqui à seqüência madura SEQ ID NO: 198 a menos que de outro modo indicado. O

resíduo 1 da IL-17A madura é Gly, que é a posição 24 do polipeptídeo de tamanho natural.

Uma seqüência de IL-17 humana está depositada sob o número de acesso Q16552 (Swiss-Prot), que mostra a IL-17A precursora de tamanho natural incluindo o peptídeo de sinal.

Uma seqüência de IL-17 de cinomolgo é mostrada como a SEQ ID NO: 162, codificada pela SEQ ID NO: 161.

Como em outro lugar aqui descrito, a IL-17A pode ser recombinante e/ou pode ser glicosilada ou não glicosilada. A IL-17A é expressada naturalmente *in vivo* na forma glicosilada ligada em N. A IL-17A glicosilada também pode ser expressada em sistemas recombinantes, por exemplo, nas células HEK EBNA. IL-17A pode ser expressada na forma não glicosilada nas células *E. coli*.

Membro de ligação

Isto descreve um membro de um par de moléculas que se ligam entre si. Os membros de um par de ligação pode ser naturalmente derivado ou de modo total ou parcial sinteticamente produzido. Um membro do par de moléculas tem uma área na sua superfície ou uma cavidade, que se liga e é portanto complementar a uma organização espacial e polar particular do outro membro do par de moléculas. Os exemplos de tipos de pares de ligação são antígeno-anticorpo, biotina-avidina, hormônio-receptor de hormônio, receptor-ligando, enzima-substrato. A presente invenção está relacionada com as reações do tipo antígeno-anticorpo.

Um membro de ligação normalmente compreende uma molécula tendo um sítio de ligação de antígeno. Por exemplo, um membro de ligação pode ser uma molécula de anticorpo ou uma proteína que não de anticorpo que compreende um sítio de ligação de antígeno.

Um sítio de ligação de antígeno pode ser fornecido por meios de combinação de CDRs nos esqueletos de proteína que não de anticorpo tais

como fibronectina ou citocromo B etc. (Haan & Maggos, 2004; Koide 1998; Nygren 1997) ou pela randomização ou mutação de resíduos de aminoácido de uma alça dentro de um esqueleto de proteína para conferir especificidade de ligação quanto a um alvo desejado. Os esqueletos para engendrar novos sítios de ligação em proteínas foram revisados em detalhes por Nygren *et al.* (1997). Os esqueletos de proteína para imitações de anticorpo são divulgados na WO/0034784, que é aqui incorporada por referência em sua totalidade, em que os inventores descrevem proteínas (imitações de anticorpo) que incluem um domínio de fibronectina tipo III tendo pelo menos uma alça randomizada. Um esqueleto adequado para enxertar uma ou mais CDRs, por exemplo, um conjunto de HCDRs ou uma HCDR e/ou LCDR3, pode ser fornecido por qualquer membro do domínio da superfamília do gene da imunoglobulina. O esqueleto pode ser uma proteína humana ou não humana. Uma vantagem de um esqueleto de proteína que não de anticorpo é que o mesmo pode fornecer um sítio de ligação de antígeno em uma molécula do esqueleto que seja menor e/ou mais fácil de fabricar do que pelo menos algumas moléculas de anticorpo. O tamanho pequeno de um membro de ligação pode conferir propriedades fisiológicas úteis tais como uma capacidade para entrar nas células, penetrar profundamente nos tecidos ou atingir alvos dentro de outras estruturas ou ligar dentro das cavidades da proteína do antígeno alvo. O uso de sítios de ligação de antígeno em esqueletos de proteína que não de anticorpo é revisado em Wess, 2004. Típicos são proteínas tendo uma cadeia principal estável e uma ou mais alças variáveis, em que a seqüência de aminoácido da alça ou alças é específica ou aleatoriamente mutada para criar um sítio de ligação de antígeno que liga o antígeno alvo. Tais proteínas incluem os domínios de ligação IgG de proteína de um de *S. aureus*, transferrina, tetranectina, fibronectina (por exemplo, 10° domínio de fibronectina tipo III) e lipocalinas. Outros métodos incluem "Microcorpos" sintéticos (Selecore GmbH), que são fundamentados em ciclotídeos -

pequenas proteínas tendo ligações de dissulfeto intra-moleculares.

Além das seqüências de anticorpo e/ou um sítio de ligação de antígeno, um membro de ligação de acordo com a presente invenção pode compreender outros aminoácidos, por exemplo, que formem um peptídeo ou polipeptídeo, tal como um domínio dobrado ou comuniquem à molécula uma outra característica funcional além da capacidade para ligar antígeno. Os membros de ligação da invenção podem carregar um rótulo detectável ou pode ser conjugado a uma toxina ou uma porção alvejadora ou enzima (por exemplo, por intermédio de uma ligação de peptidila ou ligador). Por exemplo, um membro de ligação pode compreender um sítio catalítico (por exemplo, em um domínio de enzima) assim como um sítio de ligação de antígeno, em que o sítio de ligação de antígeno liga-se ao antígeno e assim alveja o sítio catalítico ao antígeno. O sítio catalítico pode inibir a função biológica do antígeno, por exemplo, pela clivagem.

Embora, como mencionado, as CDRs possam ser carregadas por esqueletos que não de anticorpo, a estrutura para carregar uma CDR, por exemplo, CDR3 ou um conjunto de CDRs da invenção no geral será uma seqüência de cadeia pesada ou leve de anticorpo ou porção substancial desta em que a CDR ou conjunto de CDRs estão localizados em um local que corresponde à CDR ou conjunto de CDRs de domínios variáveis de anticorpo VH e VL que ocorrem naturalmente codificados pelos genes de imunoglobulina rearranjados. As estruturas e locais de domínios variáveis de imunoglobulina podem ser determinadas por referência a Kabat 1987 e atualizações desta, agora disponíveis na Internet (em immuno.bme.nwu.edu ou entrar em "Kabat" usando qualquer meio de pesquisa).

Por região de CDR ou CDR, é intencionado indicar as regiões hipervariáveis das cadeias pesadas e leves da imunoglobulina como definidas por Kabat *et al.*, (Kabat 1991a e edições posteriores). Um anticorpo tipicamente contêm 3 CDRs de cadeia pesada e 3 CDRs de cadeia leve. Os

termos CDR ou CDRs são aqui usados de modo a indicar, de acordo com o caso, uma destas regiões ou diversas ou mesmo o total, destas regiões que contêm a maioria dos resíduos de aminoácido responsáveis pela ligação pela afinidade do anticorpo para o antígeno ou o epítopo que o mesmo reconhece.

Entre as seis seqüências de CDR curtas, a terceira CDR da cadeia pesada (HCDR3) tem uma variabilidade de tamanho maior (maior diversidade essencialmente devido aos mecanismos de combinação dos genes que dão origem a ela). A mesma pode ser tão curta quanto 2 aminoácidos embora o tamanho mais longo conhecido é 26. Funcionalmente, a HCDR3 desempenha um papel em parte na determinação da especificidade do anticorpo (Segal 1974; Amit 1986; Chothia 1987; Chothia 1989; Caton 1990; Sharon 1990a; Sharon 1990b; Kabat *et al.*, 1991b).

A HCDR1 pode ter 5 aminoácidos de comprimento, que consiste dos resíduos Kabat de 31 a 35. A HCDR2 pode ter 17 aminoácidos de comprimento, que consiste dos resíduos Kabat de 50 a 65. A HCDR3 pode ter 9 aminoácidos de comprimento, que consiste dos resíduos Kabat de 95 a 102. A LCDR1 pode ter 13 aminoácidos de comprimento, que consiste dos resíduos Kabat de 24 a 34. A LCDR2 pode ter 7 aminoácidos de comprimento, que consiste dos resíduos Kabat de 50 a 56. A LCDR3 pode ter 9 aminoácidos de comprimento, que consiste dos resíduos Kabat de 89 a 97.

Molécula de Anticorpo

Isto descreve uma imunoglobulina seja natural ou de modo parcial ou total sinteticamente produzida. O termo também abrange qualquer polipeptídeo ou proteína que compreende um sítio de ligação de antígeno de anticorpo. Deve ser aqui entendido que a invenção não diz respeito aos anticorpos na forma natural, isto quer dizer que eles não estão no seu ambiente natural mas que eles são capazes de serem isolados ou obtidos pela purificação a partir de fontes naturais ou ainda obtidos pela recombinação genética ou pela síntese química e que eles podem depois conter aminoácidos

não naturais como será descrito mais tarde. Fragmentos de anticorpo que compreendem um sítio de ligação de antígeno de anticorpo incluem, mas não são limitados às moléculas tais como Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd; e diacorpos.

As moléculas de anticorpo da invenção podem ser IgG, por exemplo, IgG1.

É possível usar anticorpos monoclonais e outros anticorpos e usar técnicas da tecnologia de DNA recombinante para produzir outros anticorpos ou moléculas quiméricas que se ligam ao antígeno alvo. Tais técnicas podem envolver a introdução de DNA que codifica a região variável da imunoglobulina ou as CDRs, de um anticorpo para as regiões constantes ou regiões constantes mais regiões de matriz, de uma imunoglobulina diferente. Ver, por exemplo, EP-A-184187, GB 2188638A ou EP-A-239400 e uma grande maioria da literatura subseqüente. Um hibridoma ou outra célula que produz um anticorpo podem ser submetidos à mutação genética ou outras mudanças, que podem alterar ou não a especificidade de ligação de anticorpos produzidos.

Visto que os anticorpos podem ser modificados em vários modos, o termo "molécula de anticorpo" deve ser interpretado como abrangendo qualquer membro de ligação ou substância tendo um sítio de ligação de antígeno de anticorpo com a especificidade requerida e/ou ligação ao antígeno. Assim, este termo abrange fragmentos de anticorpo e derivados, incluindo qualquer polipeptídeo que compreende um sítio de ligação de antígeno de anticorpo, seja natural ou total ou parcialmente sintético. As moléculas quiméricas que compreendem um sítio de ligação de antígeno de anticorpo ou equivalente, fundido a um outro polipeptídeo (por exemplo, derivado de uma outra espécie ou pertencente a uma outra classe ou subclasse de anticorpo) são portanto incluídos. A clonagem e expressão de anticorpos quiméricos são descritas na EP-A-0120694 e EP-A-0125023 e uma grande

maioria da literatura subseqüente.

Outras técnicas disponíveis na técnica de engenharia de anticorpo têm tornado possível isolar anticorpos humanos e humanizados. Por exemplo, hibridomas humanos podem ser fabricados como descrito por Kontermann & Dubel (2001). A demonstração de fago, uma outra técnica estabelecida para gerar membros de ligação foi descrita em detalhes em muitas publicações tais como a WO92/01047 (debatida mais abaixo) e Patentes US US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160, US6521404 e Kontermann & Dubel (2001). Os camundongos transgênicos em que os genes de anticorpo de camundongo são inativados e funcionalmente substituídos com genes de anticorpo humano enquanto deixam intactos outros componentes do sistema imune do camundongo, podem ser usados para isolar anticorpos humano (Mendez 1997).

As moléculas de anticorpo sintéticas podem ser criadas pela expressão de genes gerados por meios de oligonucleotídeos sintetizados e montados dentro de vetores de expressão adequados, por exemplo como descrito por Knappik *et al.* (2000) ou Krebs *et al.* (2001).

Foi mostrado que os fragmentos de um anticorpo inteiro pode desempenhar a função de antígenos de ligação. Os exemplos de fragmentos de ligação são (i) o fragmento Fab que consiste dos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) o fragmento Fd que consiste dos domínios VH e CH1; (iii) o fragmento Fv que consiste dos domínios VL e VH de um anticorpo único; (iv) o fragmento dAb (Ward 1989; McCafferty 1990; Holt 2003), que consiste de um domínio VH ou VL; (v) regiões de CDR isoladas; (vi) fragmentos $F(ab')_2$, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos de Fab ligados (vii) moléculas de Fv de cadeia única (scFv), em que um domínio VH e um domínio VL são ligados por um ligador peptídico que permite que os dois

domínios associem-se para formar um sítio de ligação de antígeno (Bird 1988; Huston 1988); (viii) dímeros de Fv de cadeia única biespecíficos (PCT/US92/09965) e (ix) "diacorpos", fragmentos multivalentes ou multiespecíficos construídos pela fusão de gene (WO94/13804; Holliger 1993a). As moléculas de Fv, scFv ou diacorpo podem ser estabilizadas pela incorporação de pontes de dissulfeto que ligam os domínios VH e VL (Reiter 1996). Minicorpos que compreendem uma scFv unida a um domínio CH3 também podem ser fabricados (Hu 1996). Outros exemplos de fragmentos de ligação são Fab', que diferem dos fragmentos Fab pela adição de uns poucos resíduos no terminal carboxila do domínio CH1 de cadeia pesada, incluindo uma ou mais cisteínas da região de dobradiça de anticorpo e Fab'-SH, que é um fragmento Fab' em que o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes carregam um grupo tiol livre.

Os fragmentos de anticorpo da invenção podem ser obtidos partindo de qualquer uma das moléculas de anticorpo aqui descritas, por exemplo, moléculas de anticorpo que compreendem domínios VH e/ou VL ou CDRs de qualquer um dos anticorpos de 1 a 16, pelos métodos tais como digestão pelas enzimas, tais como pepsina ou papaína e/ou pela clivagem das pontes de dissulfeto pela redução química. Em uma outra maneira, os fragmentos de anticorpo compreendidos na presente invenção podem ser obtidos pelas técnicas de recombinação genética do mesmo modo bem conhecidas pela pessoa habilitada na técnica ou ainda pela síntese de peptídeo por meios, por exemplo, de sintetizadores de peptídeo automáticos tais como aqueles fornecidos pela companhia Applied Biosystems, etc. ou pela síntese e expressão de ácido nucleico.

Os fragmentos de anticorpo funcionais de acordo com a presente invenção incluem qualquer fragmento funcional cuja meia-vida é aumentada por uma modificação química, especialmente pela PEGuilação ou pela incorporação em um lipossoma.

Um dAb (anticorpo de domínio) é um fragmento de ligação de antígeno monomérico pequeno de um anticorpo, a saber a região variável de uma cadeia pesada ou leve de anticorpo (Holt 2003). dAbs VH ocorrem naturalmente em camelídeos (por exemplo, camelo, lhama) e podem ser produzidos pela imunização de um camelídeo com um antígeno alvo, isolando células B específicas de antígeno e clonando diretamente genes dAb de células B individuais. dAbs também são produzíveis em cultura de célula. Seu tamanho pequeno, boa solubilidade e estabilidade à temperatura os tornam de modo particular fisiologicamente úteis e adequados para a seleção e maturação de afinidade. Um membro de ligação da presente invenção pode ser um dAb que compreenda um domínio VH ou VL substancialmente como aqui apresentado ou um domínio VH ou VL que compreenda um conjunto de CDRs substancialmente como aqui apresentado.

Como aqui usado, a frase "substancialmente como apresentado" refere-se à(s) característica(s) das CDRs relevantes do domínio VH ou VL de membros de ligação aqui descritos serão idênticas ou altamente similares às regiões especificadas das quais a seqüência é aqui apresentada. Como aqui descrito, a frase "altamente similar" com respeito à(s) região(ões) especificada(s) de um ou mais domínios variáveis, é considerado que de 1 a cerca de 5, por exemplo, de 1 a 4, incluindo 1 a 3 ou 1 ou 2 ou 3 ou 4, substituições de aminoácido podem ser feitas na CDR e/ou domínio VH ou VL.

Os anticorpos biespecíficos ou bifuncionais formam uma segunda geração de anticorpos monoclonais em que duas regiões variáveis diferentes são combinadas na mesma molécula (Holliger 1999). Seu uso foi demonstrado tanto no campo do diagnóstico quanto no campo da terapia a partir da sua capacidade para recrutar novas funções efetoras ou para alvejar diversas moléculas na superfície das células de tumor. Onde anticorpos biespecíficos devam ser usados, estes podem ser convencionalmente

anticorpos biespecíficos, que podem ser fabricados em uma variedade de modos (Holliger 1993b), por exemplo, preparados quimicamente ou a partir de hibridomas híbridos ou podem ser qualquer um dos fragmentos de anticorpo biespecíficos mencionados acima. Estes anticorpos podem ser obtidos pelos métodos químicos (Glennie 1987; Repp 1995) ou métodos somáticos (Staerz 1986; Suresh 1986) mas do mesmo modo pelas técnicas de engenharia genética que permitem que a heterodimerização seja forçada e assim facilitam o processo de purificação do anticorpo procurado (Merchand 1998). Os exemplos de anticorpos biespecíficos incluem aqueles da tecnologia BiTE® em que os domínios de ligação de dois anticorpos com especificidade diferente podem ser usados e diretamente ligados por intermédio de peptídeos flexíveis curtos. Isto combina dois anticorpos em uma cadeia de polipeptídeo única, curta. Diacorpos e scFv podem ser construídos sem uma região Fc, usando apenas domínios variáveis, potencialmente reduzindo os efeitos da reação anti-idiotípica.

Os anticorpos biespecíficos podem ser construídos como IgG inteira, como Fab'2 biespecífico, como Fab'PEG, como diacorpos ou ainda como scFv biespecífica. Além disso, dois anticorpos biespecíficos podem ser ligados usando métodos de rotina conhecidos na técnica para formar anticorpos tetravalentes.

Os diacorpos biespecíficos, como opostos aos anticorpos inteiros biespecíficos, também podem ser particularmente úteis porque eles podem ser facilmente construídos e expressados na *E. coli*. Diacorpos (e muitos outros polipeptídeos tais como fragmentos de anticorpo) de especificidades de ligação apropriadas podem ser facilmente selecionados usando a demonstração de fago (WO94/13804) a partir de bibliotecas. Se um ramo do diacorpo deva ser mantido constante, por exemplo, com uma especificidade direcionada contra IL-17, então uma biblioteca pode ser fabricada onde o outro ramo é variado e um anticorpo de especificidade

apropriada selecionado. Os anticorpos inteiros biespecíficos podem ser fabricados pelos métodos de engenharia alternativa como descrito em Ridgeway 1996.

Vários métodos são disponíveis na técnica para a obtenção de anticorpos contra IL-17. Os anticorpos podem ser anticorpos monoclonais, especialmente de origem humana, de murino, quimérica ou humanizada, que podem ser obtidos de acordo com os métodos padrão bem conhecidos pela pessoa habilitada na técnica.

No geral, para a preparação de anticorpos monoclonais ou seus fragmentos funcionais, especialmente de origem de murino, é possível recorrer às técnicas que são descritas em particular no manual "Antibodies" (Harlow e Lane 1988) ou à técnica de preparação de hibridomas descrita por Kohler e Milstein, 1975.

Anticorpos monoclonais podem ser obtidos, por exemplo, a partir de uma célula animal imunizada contra IL-17 ou um de seus fragmentos contendo o epítopo reconhecido pelos ditos anticorpos monoclonais. A IL-17 ou um de seus fragmentos, podem ser especialmente produzidos de acordo com os métodos de trabalho usuais, pela recombinação genética partindo com uma seqüência de ácido nucleico contida na seqüência de cDNA que codifica a IL-17 ou fragmento desta, pela síntese de peptídeo partindo de uma seqüência de aminoácidos compreendida na seqüência de peptídeo da IL-17 e/ou fragmento desta. Os anticorpos monoclonais, por exemplo, podem ser purificados em uma coluna de afinidade em que a IL-17 ou um de seus fragmentos contendo o epítopo reconhecido pelos ditos anticorpos monoclonais, foram anteriormente imobilizados. Mais particularmente, os anticorpos monoclonais podem ser purificados pela cromatografia em proteína A e/ou G, seguida ou não pela cromatografia de troca iônica com o objetivo de eliminar os contaminantes da proteína residual assim como o DNA e o LPS, em si mesma, seguida ou não pela cromatografia de exclusão

em gel de Sepharose de modo a eliminar os agregados potenciais devido à presença de dímeros ou de outros multímeros. Em uma forma de realização, todas estas técnicas podem ser usadas simultânea ou sucessivamente.

Sítio de ligação de antígeno

Isto descreve a parte de uma molécula que se liga ao antígeno alvo e é complementar a todo ou parte do mesmo. Em uma molécula de anticorpo o mesmo é aludido como o sítio de ligação de antígeno de anticorpo e compreende a parte do anticorpo que se liga ao antígeno alvo e é complementar a todo ou parte do mesmo. Onde um antígeno é grande, um anticorpo pode apenas ligar a uma parte particular do antígeno, parte esta que é chamada de um epítopo. Um sítio de ligação de antígeno de anticorpo pode ser fornecido por um ou mais domínios variáveis de anticorpo. Um sítio de ligação de antígeno de anticorpo pode compreender uma região variável de cadeia leve (VL) de anticorpo e uma região variável de cadeia pesada (VH) de anticorpo.

Isolado

Isto refere-se ao estado em que membros de ligação da invenção ou o ácido nucleico que codifica tais membros de ligação, no geral estarão de acordo com a presente invenção. Assim, membros de ligação, domínios VH e/ou VL e moléculas de ácido nucleico codificadoras e vetores de acordo com a presente invenção podem ser fornecidos isolados e/ou purificados, por exemplo, do seu ambiente natural, na forma substancialmente pura ou homogênea, ou, no caso de ácido nucleico, livre ou substancialmente livre de ácido nucleico ou genes de origem outra que não da seqüência que codifica um polipeptídeo com a função requerida. Os membros isolados e ácido nucleico isolado serão livres ou substancialmente livres de material com o qual os mesmos estão naturalmente associados tais como outros polipeptídeos ou ácidos nucleicos com os quais eles são encontrados no seu ambiente natural ou no ambiente no qual eles são preparados (por exemplo,

cultura de célula) quando tal preparação é pela tecnologia de DNA recombinante praticada *in vitro* ou *in vivo*. Membros e ácido nucleico podem ser formulados com diluentes ou adjuvantes e ainda com propósitos práticos ser isolados - por exemplo os membros normalmente serão misturados com gelatina ou outros carregadores se usados para revestir placas de microtítulo para o uso em imunoensaios ou serão misturados com carregadores ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis quando usados em diagnóstico ou terapia. Os membros de ligação podem ser glicosilados, naturalmente ou por sistemas de células eucarióticas heterólogas (por exemplo, células CHO ou NSO (ECACC 85110503)) ou os mesmos podem ser (por exemplo se produzidos pela expressão em uma célula procariótica) não glicosilados.

As preparações heterogêneas que compreendem moléculas de anticorpo anti-IL-17 também formam parte da invenção. Por exemplo, tais preparações podem ser misturas de anticorpos com cadeia pesadas de tamanho natural e cadeias pesadas que carecem da lisina do terminal C, com vários graus de glicosilação e/ou com aminoácidos derivados, tais como ciclização de um ácido glutâmico de terminal N para formar um resíduo de ácido piroglutâmico.

Descrição Resumida dos Desenhos

Figura 1. seqüência de aminoácido de IL-17A humana rotulada no terminal N (SEQ ID NO: 197). Os resíduos de 1 a 21 do rótulo no terminal N são mostrados sublinhados. Os resíduos de 92 a 108, que correspondem aos resíduos de 71 a 87 da IL-17A humana madura, são colocados em caixa (SEQ ID NO: 199).

Figura 2. seqüência de aminoácido da IL-17A humana precursora de tamanho natural com rótulo His5 no terminal C (SEQ ID NO: 200). O peptídeo de sinal do terminal N dos 23 resíduos de aminoácido é mostrado sublinhado. Os resíduos mutados da IL-17A humana do tipo selvagem (SEQ ID NO: 198) estão em negrito e sublinhados, dentro da

seqüência colocada em caixa SEQ ID NO: 199 que corresponde aos resíduos 71 a 87 da IL-17A humana madura. A IL-17A humana mutante madura, sem peptídeo de terminal N e rótulo His, é a SEQ ID NO: 201.

Descrição Detalhada

Como mencionado acima, um membro de ligação de acordo com a presente invenção modula e pode neutralizar uma atividade biológica de IL-17. Como aqui descrito, membros de ligação de IL-17 da presente invenção podem ser otimizados quanto a potência de neutralização. No geral, a otimização de potência envolve mutar a seqüência de um membro de ligação selecionado (normalmente a seqüência do domínio variável de um anticorpo) para gerar uma biblioteca de membros de ligação, que são depois ensaiadas quanto a potência e os membros de ligação mais potentes são selecionados. Assim os membros de ligação "otimizados em potência" selecionados tendem a ter uma potência mais alta do que o membro de ligação a partir do qual a biblioteca foi gerada. Não obstante, membros de ligação de potência alta também podem ser obtidos sem a otimização, por exemplo um membro de ligação de potência alta pode ser obtido diretamente a partir de uma triagem inicial por exemplo, um ensaio de neutralização bioquímica. Um membro de ligação "otimizado em potência" refere-se a um membro de ligação com uma potência otimizada de neutralização de uma atividade particular ou função a jusante de IL-17. Os ensaios e potências são descritos em mais detalhes aqui em outro lugar. A presente invenção fornece membros de ligação tanto otimizados em potência quanto não otimizados, assim como métodos para a otimização da potência de um membro de ligação selecionado. A presente invenção permite assim que a pessoa habilitada gere membros de ligação tendo potência alta.

Embora a otimização de potência possa ser usada para gerar membros de ligação de potência mais alta de um dado membro de ligação, também é mencionado que os membros de ligação de potência alta possam ser

obtidos mesmo sem otimização de potência.

Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método de obter um ou mais membros de ligação capazes de ligar o antígeno, o método incluindo levar em contato uma biblioteca de membros de ligação de acordo com a invenção e o dito antígeno e selecionar um ou mais membros de ligação da biblioteca capaz de ligar o dito antígeno.

A biblioteca pode ser demonstrada em partículas ou complexos moleculares, por exemplo, pacotes genéticos replicáveis tais como partículas de levedura, bacterianas ou de bacteriófago (por exemplo, T7), vírus, células ou sistemas covalentes, ribossômicos ou outros demonstrados *in vitro*, cada partícula ou complexo molecular contendo ácido nucleico que codifica o domínio variável VH de anticorpo demonstrado nele e opcionalmente também um domínio VL demonstrado se presente. A demonstração de fago é descrita na WO92/01047 e por exemplo, nas patentes US US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160 e US6521404, cada uma das quais é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

A seguir da seleção de membros de ligação capazes de ligar o antígeno e demonstrado em bacteriófago ou outras partículas da biblioteca ou complexos moleculares, o ácido nucleico pode ser tirado de um bacteriófago ou outra partícula ou complexo molecular demonstrando um dito membro de ligação selecionado. Tal ácido nucleico pode ser usado na produção subseqüente de um membro de ligação ou um domínio variável VH ou VL de anticorpo pela expressão de ácido nucleico com a seqüência de ácido nucleico tirada de um bacteriófago ou outra partícula ou complexo molecular demonstrando um dito membro de ligação selecionado.

Um domínio variável VH de anticorpo com a seqüência de aminoácido de um domínio variável VH de anticorpo de um dito membro de

ligação selecionado pode ser fornecido na forma isolada, como pode um membro de ligação que compreende um tal domínio VH.

A capacidade para ligar IL-17 pode ser ainda testada, também a capacidade para competir por exemplo, com uma molécula de anticorpo precursora ou uma molécula de anticorpo de 1 a 16 (por exemplo, no formato scFv e/ou formato IgG, por exemplo, IgG1) para a ligação a IL-17. A capacidade para neutralizar IL-17 pode ser testada, como ainda debatido aqui em outro lugar.

Um membro de ligação de acordo com a presente invenção pode ligar IL-17 com a afinidade de um dos anticorpos de 1 a 16 por exemplo, no formato scFv ou IgG1 ou com uma afinidade que seja melhor.

Um membro de ligação de acordo com a presente invenção pode neutralizar uma atividade biológica de IL-17 com a potência de um dos anticorpos de 1 a 16 por exemplo, no formato scFv ou IgG1 ou com uma potência que seja melhor.

A afinidade de ligação e a potência de neutralização de membros de ligação diferentes podem ser comparadas sob condições apropriadas.

Variantes de moléculas de anticorpo aqui divulgadas podem ser produzidas e usadas na presente invenção. Seguindo a conduta da química computacional na aplicação de técnicas de análise de dados multivariadas para as relações de estrutura/propriedade-atividade (Wold 1984) as relações de atividade-propriedade quantitativas de anticorpos podem ser derivadas usando técnicas matemáticas bem conhecidas tais como a regressão estatística, reconhecimento de padrão e classificação (Norman 1998; Kandel & Backer 1995; Krzanowski 2000; Witten & Frank 1999; Denison (Ed) 2002; Ghose & Viswanadhan). As propriedades de anticorpos podem ser derivadas de modelos empíricos e teóricos (por exemplo, a análise de resíduos de contato prováveis ou propriedade físico-química calculada) de seqüência de

anticorpo, estruturas funcionais e tridimensionais e estas propriedades podem ser consideradas isoladamente e em combinação.

Um sítio de ligação de antígeno de anticorpo composto de um domínio VH e um domínio VL é tipicamente formado por seis alças de polipeptídeo: três do domínio variável de cadeia leve (VL) e três do domínio variável de cadeia pesada (VH). A análise de anticorpos de estrutura atômica conhecida elucidou as relações entre a seqüência e a estrutura tridimensional de sítios de combinação de anticorpo (Chothia 1992; Al-Lazikani 1997). Estas relações implicam que, exceto para a terceira região (alça) nos domínios VH, as alças de sítio de ligação têm um de um número pequeno de conformações de cadeia principal: estruturas canônicas. A estrutura canônica formada em uma alça particular foi mostrada ser determinada pelo seu tamanho e a presença de certos resíduos nos sítios chave tanto nas regiões de alça quanto nas regiões de matriz (Chothia 1992; Al-Lazikani 1997).

Este estudo de relação de seqüência-estrutura pode ser usado para o prognóstico daqueles resíduos em um anticorpo de seqüência conhecida, mas de uma estrutura tridimensional desconhecida, que são importantes na manutenção da estrutura tridimensional das suas alças de CDR e por este motivo mantém especificidade de ligação. Estes prognósticos podem ser apoiado pela comparação dos prognósticos para a produção de experimentos de otimização de conduta. Em um método estrutural, um modelo pode ser criado a partir da molécula de anticorpo (Chothia 1986) usando qualquer pacote livremente disponível ou comercial tal como WAM (Whitelegg & Rees 2000). Um pacote de software de visualização e análise de proteína tal como Insight II (Accelerys, Inc.) ou Deep View (Guex & Peitsch 1997) podem ser depois usados para avaliar substituições possíveis em cada posição na CDR. Esta informação pode ser depois usada para fabricar substituições prováveis de ter um efeito mínimo ou benéfico sobre a atividade.

As técnicas requeridas para fabricar substituições dentro das seqüências de aminoácido das CDRs, domínios VH ou VL de anticorpo e membros de ligação no geral são disponíveis na técnica. As seqüências variantes podem ser fabricadas, com substituições que podem ou ser prognosticadas ou não ter um efeito mínimo ou benéfico sobre a atividade e testadas quanto a capacidade para ligar e/ou neutralizar IL-17 e/ou quanto a qualquer outra propriedade desejada.

As variantes de seqüência de aminoácido do domínio variável de qualquer um dos domínios VH e VL cujas seqüências são aqui especificamente divulgadas podem ser utilizadas de acordo com a presente invenção, como debatido. As variantes particulares podem incluir uma ou mais alterações de seqüência de aminoácido (adição, deleção, substituição e/ou inserção de um resíduo de aminoácido), pode ser menor do que cerca de 20 alterações, menor do que cerca de 15 alterações, menor do que cerca de 10 alterações ou menor do que cerca de 5 alterações, pode ser 5, 4, 3, 2 ou 1. As alterações podem ser fabricadas em uma ou mais regiões de matriz e/ou uma ou mais CDRs. As alterações normalmente não resultam na perda de função, de modo que um membro de ligação que compreende uma seqüência de aminoácido assim alterada possa reter uma capacidade para ligar e/ou neutralizar IL-17. Por exemplo, o mesmo pode reter a mesma capacidade de ligação e/ou neutralização quantitativas em relação a um membro de ligação em que a alteração não é feita, por exemplo, como medido em um ensaio aqui descrito. O membro de ligação que compreende uma seqüência de aminoácido assim alterada pode ter uma capacidade melhorada para ligar e/ou neutralizar IL-17.

A alteração pode compreender substituir um ou mais resíduos de aminoácido com um aminoácido que não ocorre naturalmente ou não padrão, modificando um ou mais resíduos de aminoácido em uma forma que não ocorre naturalmente ou não padrão ou inserindo um ou mais aminoácidos

que não ocorrem naturalmente ou não padrão na seqüência. Os números e locais de exemplo de alterações nas seqüências da invenção estão em outro lugar aqui descritos. Os aminoácidos que ocorrem naturalmente incluem os 20 L-aminoácidos padrão identificados como G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D e pelos seus códigos de letra única padrão. Os aminoácidos não padrão incluem qualquer outro resíduo que possa ser incorporado em uma cadeia principal de polipeptídeo ou resulte da modificação de um resíduo de aminoácido existente. Os aminoácidos não padrão podem ser de ocorrência natural ou de ocorrência não natural. Diversos aminoácidos não padrão que ocorrem naturalmente são conhecidos na técnica, tais como 4-hidroxiprolina, 5-hidroxilisina, 3-metilistidina, N-acetilserina, etc. (Voet & Voet 1995). Aqueles resíduos de aminoácido que são derivados na sua posição N-alfa serão localizados apenas no término N de uma seqüência de aminoácido. Normalmente na presente invenção um aminoácido é um L-aminoácido, mas em algumas formas de realização pode ser um D-aminoácido. A alteração pode portanto compreender modificar um L-aminoácido em um D-aminoácido ou substituí-lo com o mesmo. As formas metiladas, acetiladas e/ou fosforiladas de aminoácidos também são conhecidas e os aminoácidos na presente invenção podem ser submetidos a tal modificação.

As seqüências de aminoácido em domínios de anticorpo e membros de ligação da invenção podem compreender os aminoácidos não naturais ou não padrão descritos acima. Em algumas formas de realização aminoácidos não padrão (por exemplo, D-aminoácidos) podem ser incorporados em uma seqüência de aminoácido durante a síntese, enquanto em outras formas de realização os aminoácidos não padrão podem ser introduzidos pela modificação ou substituição dos aminoácidos padrão "original" depois da síntese da seqüência de aminoácido.

O uso de aminoácidos não padrão e/ou que não ocorrem

naturalmente aumenta a diversidade estrutural e funcional e assim pode aumentar o potencial para a obtenção das propriedades de ligação e neutralização da IL-17 desejadas em um membro de ligação da invenção. Adicionalmente, D-aminoácidos e análogos foram mostrados ter melhores perfis farmacocinéticos comparados com L-aminoácidos padrão, devido à degradação *in vivo* de polipeptídeos tendo L-aminoácidos depois da administração a um animal por exemplo, um ser humano.

Novas regiões VH ou VL que carregam seqüências derivadas de CDR da invenção podem ser geradas usando a mutagênese aleatória de um ou mais genes VH e/ou VL selecionados para gerar mutações dentro do domínio variável inteiro. Um tal técnica é descrita por Gram *et al.* (1992), que usou a PCR propensa a erro. Em algumas formas de realização uma ou duas substituições de aminoácido são feitas dentro de um domínio variável inteiro ou conjuntos de CDR. Um outro método que pode ser usado é administrar a mutagênese às regiões CDR de genes VH ou VL. Tais técnicas são divulgadas por Barbas *et al.* (1994) e Schier *et al.* (1996).

Todas as técnicas descritas acima são conhecidas como tal na técnica e a pessoa habilitada será capaz de usar tais técnicas para fornecer membros de ligação da invenção usando metodologia de rotina na técnica.

Um outro aspecto da invenção fornece um método para obter um sítio de ligação de antígeno de anticorpo para IL-17, o método compreendendo fornecer por intermédio de adição, deleção, substituição ou inserção de um ou mais aminoácidos na seqüência de aminoácido de um domínio VH aqui apresentado um domínio VH que é uma seqüência de aminoácido variante do domínio VH, combinando opcionalmente o domínio VH assim fornecido com um ou mais domínios VL e testando o domínio VH ou a combinação ou combinações VH/VL para identificar um membro de ligação ou um sítio de ligação de antígeno de anticorpo para IL-17 e opcionalmente com uma ou mais propriedades funcionais, por exemplo,

capacidade para neutralizar a atividade de IL-17. O dito domínio VL pode ter uma seqüência de aminoácido que é substancialmente como aqui apresentada. Um método análogo pode ser utilizado em que uma ou mais variantes de seqüência de um domínio VL aqui divulgado são combinados com um ou mais domínios VH.

Como mencionado acima, uma seqüência de aminoácido de CDR substancialmente como aqui apresentada pode ser carregada como uma CDR em um domínio variável de anticorpo humano ou uma porção substancial deste. As seqüências HCDR3 substancialmente como aqui apresentadas representam formas de realização da presente invenção e por exemplo cada uma destas pode ser carregada como uma HCDR3 em um domínio variável de cadeia pesada humano ou uma porção substancial deste.

Os domínios variáveis utilizados na invenção podem ser obtidos ou derivados de qualquer linha germinativa ou domínio variável humano rearranjado ou podem ser um domínio variável sintético com base nas seqüências de consenso ou real de domínios variáveis humanos conhecidos. Um domínio variável pode ser derivado de um anticorpo não humano. Uma seqüência de CDR da invenção (por exemplo, CDR3) pode ser introduzida em um repertório de domínios variáveis que carecem de uma CDR (por exemplo, CDR3), usando a tecnologia de DNA recombinante. Por exemplo, Marks *et al.* (1992) descreve métodos de produzir repertórios de domínios variáveis de anticorpo em que os iniciadores de consenso direcionados ou adjacentes à extremidade 5' da área do domínio variável são usados em conjunção com iniciadores de consenso para a terceira região de matriz de genes VH humanos para fornecer um repertório de domínios variáveis VH que carecem de uma CDR3. Marks *et al.* descrevem ainda como este repertório pode ser combinado com uma CDR3 de um anticorpo particular. Usando técnicas análogas, as seqüências derivadas de CDR3 da presente invenção podem ser embaralhadas com repertórios de domínios VH

ou VL que carecem de uma CDR3 e os domínios VH ou VL embaralhados completos combinados com um domínio VL ou VH cognato para fornecer membros de ligação da invenção. O repertório pode ser depois demonstrado em um sistema hospedeiro adequado tal como o sistema de demonstração de fago da WO92/01047, que é aqui incorporada por referência em sua totalidade ou qualquer um de uma grande maioria subseqüente de literatura, incluindo Kay, Winter & McCafferty (1996), de modo que membros de ligação adequados possam ser selecionados. Um repertório pode consistir de qualquer de 10^4 membros individuais para cima, por exemplo pelo menos 10^5, pelo menos 10^6, pelo menos 10^7, pelo menos 10^8, pelo menos 10^9 ou pelo menos 10^{10} membros. Outros sistemas hospedeiros adequados incluem, mas não são limitados à, demonstração de levedura, demonstração bacteriana, demonstração de T7, demonstração viral, demonstração de célula, demonstração de ribossoma e demonstração covalente.

Técnicas de embaralhamento ou combinatórias análogas também são divulgadas por Stemmer (1994), que descreve a técnica em relação a um gene da β-lactamase mas observa que o método pode ser usado para a geração de anticorpos.

Um método de preparar um membro de ligação para o antígeno IL-17 é fornecido, método este que compreende:

(a) fornecer um repertório de partida de ácidos nucleicos que codificam um domínio VH que incluem uma CDR3 a ser substituída ou carecem de uma região CDR3 codificadora;

(b) combinar o dito repertório com um doador de ácido nucleico que codifica uma seqüência de aminoácido substancialmente como aqui apresentada para uma VH CDR3 tal que o dito doador de ácido nucleico é inserido na região CDR3 no repertório, de modo a fornecer um repertório de produto de ácidos nucleicos que codificam um domínio VH;

(c) expressar os ácidos nucleicos do dito repertório de produto;

(d) selecionar um membro de ligação para IL-17; e

(e) recuperar o dito membro de ligação ou ácido nucleico que o codifica.

Mais uma vez, um método análogo pode ser utilizado em que um VL CDR3 da invenção é combinado com um repertório de ácidos nucleicos que codificam um domínio VL que incluem uma CDR3 a ser substituída ou carecem de uma região CDR3 codificadora.

Similarmente, uma ou mais ou todas as três CDRs podem ser enxertadas em um repertório de domínios VH ou VL que são depois triados quanto a um membro de ligação ou membros de ligação para IL-17.

Em uma forma de realização, um ou mais do anticorpo precursor ou anticorpos de 2 a 16 de HCDR1, HCDR2 e HCDR3 ou o anticorpo precursor ou conjunto de anticorpos de 2 a 16 de HCDRs, podem ser utilizados e/ou um ou mais do anticorpo precursor ou anticorpos de 2 a 16 de LCDR1, LCDR2 e LCDR3 ou o anticorpo precursor ou conjunto de anticorpos de 2 a 16 de LCDRs podem ser utilizados.

Similarmente, outros domínios VH e VL, conjuntos de CDRs e conjuntos de HCDRs e/ou conjuntos de LCDRs aqui divulgados podem ser utilizados.

Em algumas formas de realização, uma porção substancial de um domínio variável de imunoglobulina compreenderá pelo menos as três regiões de CDR, junto com suas regiões de matriz intervenientes. A porção também pode incluir pelo menos cerca de 50% de cada uma ou de ambas da primeira e quarta regiões de matriz, os 50% sendo os 50% de terminal C da primeira região de matriz e os 50% do terminal N da quarta região de matriz. Os resíduos adicionais na extremidade de terminal N ou terminal C da parte substancial do domínio variável podem ser aqueles não normalmente associados com regiões de domínio variável que ocorrem naturalmente. Por exemplo, a construção de membros de ligação da presente invenção

fabricados pelas técnicas de DNA recombinante pode resultar na introdução de resíduos de terminal N ou C codificados pelos ligadores introduzidos para facilitar a clonagem ou outras etapas de manipulação. Outras etapas de manipulação incluem a introdução de ligadores para unir domínios variáveis da invenção a outras seqüências de proteína incluindo regiões constantes de anticorpo, outros domínios variáveis (por exemplo na produção de diacorpos) ou rótulos detectáveis/funcionais como debatido em mais detalhes aqui em outro lugar.

Embora em alguns aspectos da invenção, membros de ligação compreendem um par de domínios VH e VL, domínios de ligação única com base nas seqüências de domínio VH ou VL formam outros aspectos da invenção. É conhecido que domínios de imunoglobulina únicos, especialmente domínios VH, são capazes de ligar antígenos alvo em uma maneira específica. Por exemplo, ver o debate de dAbs acima.

No caso de cada um dos domínios de ligação única, estes domínios podem ser usados para triar quanto a domínios complementares capazes de formar um membro de ligação de dois domínios capaz de ligar IL-17. Isto pode ser obtido pelos métodos de triagem pela demonstração de fago usando o chamado método combinatório duplo hierárquico como divulgado na WO92/01047, aqui incorporada por referência em sua totalidade, em que uma colônia individual contendo um clone de cadeia H ou L é usada para infectar uma biblioteca completa de clones que codificam a outra cadeia (L ou H) e o membro de ligação de cadeia dupla resultante é selecionado de acordo com técnicas de demonstração de fago tais como aquelas descritas nesta referência. Esta técnica também é divulgada em Marks 1992.

Membros de ligação da presente invenção podem compreender ainda regiões constantes de anticorpo ou partes destes, por exemplo, regiões constantes de anticorpo humano ou partes destas. Por exemplo, um domínio VL pode ser ligado pela sua extremidade de terminal C aos domínios

constantes de cadeia leve de anticorpo incluindo cadeias Cκ ou Cλ humanas, por exemplo, cadeias Cλ Similarmente, um membro de ligação com base em um domínio VH pode ser ligado pela sua extremidade de terminal C a toda ou parte (por exemplo, um domínio CH1) de uma cadeia pesada de imunoglobulina derivada de qualquer isótipo de anticorpo, por exemplo, IgG, IgA, IgE e IgM e qualquer uma das subclasses de isótipo, particularmente IgG1 e IgG4. IgG1 é vantajosa, devido à sua função efetora e facilidade de fabricação. Qualquer variante de região constante sintética ou outra que tenham estas propriedades e estabilizem as regiões variáveis também são úteis nas formas de realização da presente invenção.

Os membros de ligação da invenção podem ser rotulados com um rótulo detectável ou funcional. Um rótulo pode ser qualquer molécula que produza ou possa ser induzida para produzir um sinal, incluindo mas não limitada a fluorescedores, radiorrótulos, enzimas, quimioluminescedores ou fotossensibizadores. Assim, a ligação pode ser detectada e/ou medida pela detecção da fluorescência ou luminescência, radioatividade, atividade de enzima ou absorbância de luz.

Os rótulos adequados incluem, por via de ilustração e não de limitação, enzimas tais como a fosfatase alcalina, glicose-6-fosfato desidrogenase ("G6PDH") e rábano peroxidase; corantes; fluorescedores, tais como fluoresceína, compostos de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldeído, fluorescamina, fluoróforos tais como criptatos lantanídeos e quelatos (Perkin Elmer e Cis Biointernational); quimioluminescedores tais como isoluminol; sensibilizadores; coenzimas; substratos de enzima; radiorrótulos incluindo mas não limitados a ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S, ^{32}P, ^{14}C, ^{3}H, ^{57}Co, ^{99}Tc e ^{75}Se e outros radiorrótulos aqui mencionados; partículas tais como látex ou partículas de carbono; sol metálico; cristalita; lipossomas; células, etc., que podem ser ainda rotuladas com um corante, catalisador ou outro grupo detectável.

As enzimas e coenzimas adequadas são divulgadas em Litman, *et al.*, Pat. U.S. Nº 4.275.149 e Boguslaski, *et al.*, Pat. U.S. Nº 4.318.980, cada uma das quais são aqui incorporadas por referência em suas totalidades. Os fluorescedores e quimioluminescedores adequados são divulgados em Litman, *et al.*, Pat. U.S. Nº 4.275.149, que é aqui incorporada por referência em sua totalidade. Os rótulos incluem ainda porções químicas tais como biotina que podem ser detectadas por intermédio da ligação a uma porção detectável cognata específica, por exemplo, avidina ou estreptavidina rotuladas. Os rótulos detectáveis podem ser ligados aos anticorpos da invenção usando química convencional conhecida na técnica.

Existem numerosos métodos pelos quais o rótulo pode produzir um sinal detectável por meios externos, por exemplo, pela examinação visual, radiação eletromagnética, calor e reagentes químicos. O rótulo também pode ser ligado a um outro membro de ligação que se liga ao anticorpo da invenção ou a um suporte.

O rótulo pode diretamente produzir um sinal e portanto, componentes adicionais não são requeridos para produzir um sinal. Numerosas moléculas orgânicas, por exemplo fluorescedores, são capazes de absorver luz ultravioleta e visível, onde a absorção de luz transfere energia para estas moléculas e as eleva para um estado de energia excitado. Esta energia absorvida é depois dissipada pela emissão de luz em um segundo comprimento de onda. Esta segunda emissão de comprimento de onda também pode transferir energia a uma molécula aceitadora rotulada e a energia resultante dissipada a partir da molécula aceitadora pela emissão de luz por exemplo transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET). Outros rótulos que diretamente produzem um sinal incluem isótopos e corantes radioativos.

Alternativamente, o rótulo pode precisar de outros componentes para produzir um sinal e o sistema que produz sinal incluiria

então todos os componentes requeridos para produzir um sinal mensurável, que pode incluir substratos, coenzimas, realçadores, enzimas adicionais, substâncias que reagem com produtos de enzima, catalisadores, ativadores, cofatores, inibidores, descontaminantes, íons metálicos e uma substância de ligação específica requerida para a ligação de substâncias que geram sinal. Um debate detalhado de sistemas que produzem sinal adequados pode ser encontrado em Ullman, *et al.* Pat. U.S. Nº 5.185.243, que é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

O membro de ligação, anticorpo ou um de seus fragmentos funcionais, podem estar presentes na forma de um imunoconjugado de modo a obter um sinal detectável e/ou quantificável. Os imunoconjugados podem ser conjugados, por exemplo, com enzimas tais como peroxidase, fosfatase alcalina, alfa-D-galactosidase, glicose oxidase, glicose amilase, anidrase carbônica, acetilcolinesterase, lisozima, malato desidrogenase ou glicose 6-fosfato desidrogenase ou por uma molécula tal como biotina, digoxigenina ou 5-bromodesoxiuridina. Os rótulos fluorescentes podem ser do mesmo modo conjugados aos imunoconjugados ou aos seus fragmentos funcionais de acordo com a invenção e especialmente incluem fluoresceína e seus derivados, fluorocromo, rodamina e seus derivados, GFP (GFP para "Proteína Fluorescente Verde"), dansil, umbeliferona, quelatos ou criptatos de lantanídeos por exemplo, Európio etc. Os imunoconjugados ou seus fragmentos funcionais podem ser preparados pelos métodos conhecidos pela pessoa habilitada na técnica. Eles podem ser ligados às enzimas ou aos rótulos fluorescentes diretamente ou por intermédio de um grupo espaçador ou de um grupo de ligação tal como um polialdeído, como glutaraldeído, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), ácido dietileno-triaminopentaacético (DPTA) ou na presença de agentes de ligação tais como aqueles mencionados acima para os conjugados terapêuticos. Os conjugados contendo rótulos do tipo fluoresceína podem ser preparados pela reação com um isotiocianato.

Outros imunoconjugados podem do mesmo modo incluir rótulos quimioluminescentes tais como luminol e os dioxetanos, rótulos bioluminescentes tais como luciferase e luciferina ou ainda rótulos radioativos tais como iodo123, iodo125, iodo126, iodo131, iodo133, bromo77, tecnécio99m, índio111, índio113m, gálio67, gálio68, enxofre35, fósforo32, carbonol4, trítio (hidrogênio3), cobalto57, selênio75, rutênio95, rutênio97, rutênio103, rutênio105, mercúrio107, mercúrio203, rênio99m, rênio101, rênio105, escândio47, telúrio121m, telúrio122m, telúrio125m, túlio165, túlio167, túlio168, flúor8, ítrio199. Os métodos conhecido pela pessoa habilitada na técnica que existem para ligar os radioisótopos terapêuticos aos anticorpos diretamente ou por intermédio de um agente quelador tal como EDTA, DTPA mencionados acima podem ser usados para os radioelementos que podem ser usados em diagnóstico. Do mesmo modo é possível mencionar a rotulação com Na[I^{125}] pelo método da cloramina T (Hunter e Greenwood 1962) ou ainda com tecnécio99m pela técnica de Crockford *et al.*, (Pat. U.S. Nº 4.424.200, aqui incorporada por referência em sua totalidade) ou ligado por intermédio de DTPA como descrito por Hnatowich (Pat. U.S. Nº 4.479.930, aqui incorporada por referência em sua totalidade). Outros imunoconjugados podem incluir uma porção de toxina tal como por exemplo uma porção de toxina selecionada de um grupo de exotoxinas de *Pseudomonas* (PE ou um fragmento ou mutante citotóxicos destas), toxina da difteria ou um fragmento ou mutante citotóxicos desta, uma toxina botulínica de A até F, ricina ou um fragmento citotóxico desta, abrina ou um fragmento citotóxico desta, saporina ou um fragmento citotóxico desta, toxina antiviral do caruru-de-cacho ou um fragmento citotóxico deste e briodina 1 ou um fragmento citotóxico desta.

A presente invenção fornece um método que compreende causar ou permitir a ligação de um membro de ligação como fornecido aqui para IL-17. Como mencionado, tal ligação pode ocorrer *in vivo*, por exemplo,

a seguir da administração de um membro de ligação ou ácido nucleico que codifica um membro de ligação ou a mesma pode ocorrer *in vitro*, por exemplo em ELISA, Western blotting, imunocitoquímica, imunoprecipitação, cromatografia de afinidade e bioquímica ou ensaios com base em célula tais como são aqui descritos. A invenção também fornece medir os níveis de antígeno diretamente, pela utilização de um membro de ligação de acordo com a invenção por exemplo em um sistema de biossensor.

Por exemplo, a presente invenção compreende um método de detectar e/ou medir a ligação à IL-17, que compreende, (i) expor o dito membro de ligação à IL-17 e (ii) detectar a ligação do dito membro de ligação à IL-17, em que a ligação é detectada usando qualquer método ou rótulo detectável aqui descritos. Este e qualquer outro método de detecção de ligação aqui descritos, podem ser interpretados diretamente pela pessoa que realiza o método, por exemplo, observando-se visualmente um rótulo detectável. Alternativamente, este método ou qualquer outro método de detecção de ligação aqui descritos, podem produzir um relato na forma de uma autorradiografia, um fotografia, uma listagem de computador, um relato de citometria de fluxo, um gráfico, um mapa, um tubo ou recipiente ou reservatório de teste contendo o resultado ou qualquer outra representação visual ou física de um resultado do método.

A quantidade de ligação de membro de ligação à IL-17 pode ser determinada. A quantificação pode estar relacionada com a quantidade do antígeno em uma amostra de teste, que pode ser de interesse diagnóstico. A triagem quanto a ligação para IL-17 e/ou a sua quantificação pode ser útil, por exemplo, na triagem de pacientes quanto a doenças ou distúrbios associados com IL-17, tais como são aludidas aqui em outro lugar. Em uma forma de realização, entre outros, um método de diagnóstico da invenção compreende (i) obter uma amostra de tecido ou fluido de um paciente, (ii) expor a dita amostra de tecido ou fluido a um ou mais membros de ligação da presente

invenção; e (iii) detectar a ligação de IL-17 quando comparada a uma amostra de controle, em que um aumento na quantidade de ligação de IL-17 quando comparada com o controle pode indicar um nível aberrante de expressão ou atividade de IL-17. As amostras de tecido ou fluido a serem testadas incluem sangue, soro, urina, material de biópsia, tumores ou qualquer tecido suspeito de conter níveis de IL-17 aberrantes. Pacientes testando positivo quanto aos níveis ou atividade de IL-17 aberrantes também podem se beneficiar dos métodos de tratamento divulgados aqui mais tarde.

Aqueles habilitados na técnica são capazes de escolher um modo adequado de determinar a ligação do membro de ligação a um antígeno de acordo com a sua preferência e conhecimento geral, considerando os métodos aqui divulgados.

As reatividades de membros de ligação em uma amostra podem ser determinadas por quaisquer meios apropriados. O radioimunoensaio (RIA) é uma possibilidade. O antígeno rotulado radioativo é misturado com antígeno não rotulado (a amostra de teste) e deixado ligar ao membro de ligação. O antígeno ligado é fisicamente separado do antígeno não ligado e a quantidade de antígeno radioativo ligado ao membro de ligação determinado. Quanto mais antígeno existe na amostra de teste menos antígeno radioativo ligar-se-á ao membro de ligação. Um ensaio de ligação competitivo também pode ser usado com antígeno não radioativo, usando antígeno ou um análogo ligado a uma molécula repórter. A molécula repórter pode ser um fluorocromo, fósforo ou corante a laser com características de absorção ou emissão espectralmente isolados. Os fluorocromos adequados incluem fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, Vermelho Texas e quelatos de lantanídeo ou criptatos. Os corantes cromogênicos adequados incluem diaminobenzidina.

Outros repórteres incluem partículas coloidais macromoleculares ou material particulado tais como pérolas de látex que são coloridas, agentes magnéticos ou paramagnéticos e biológica ou

quimicamente ativos que podem direta ou indiretamente causar sinais detectáveis para serem visualmente observados, eletronicamente detectados ou de outro modo registrados. Estas moléculas podem ser enzimas, reações catalisadoras que desenvolvem ou mudam de cor ou causam mudanças nas propriedades elétricas, por exemplo. Elas podem ser molecularmente excitáveis, tal que as transições eletrônicas entre estados de energia resultam em absorções ou emissões espectrais características. Estas podem incluir entidades químicas usadas em conjunção com biossensores. Biotina/avidina ou biotina/estreptavidina e sistemas de detecção pela fosfatase alcalina podem ser utilizados.

Os sinais gerados pelos conjugados de membro de ligação-repórter individuais podem ser usados para derivar dados quantificáveis absolutos ou relativos da ligação do membro de ligação relevante nas amostras (normal e de teste).

Um kit que compreende um membro de ligação de acordo com qualquer aspecto ou forma de realização da presente invenção é também fornecido como um aspecto da presente invenção. No kit, o membro de ligação pode ser rotulado para permitir que a sua reatividade em uma amostra seja determinada, por exemplo, como descrito mais abaixo. Além disso, o membro de ligação pode ser ligado ou não a um suporte sólido. Os componentes de um kit são no geral estéreis e em frascos selados ou outros recipientes. Os kits podem ser utilizados em análise de diagnóstico ou outros métodos para os quais membros de ligação são úteis. Um kit pode conter instruções para o uso dos componentes em um método, por exemplo, um método de acordo com a presente invenção. Materiais auxiliares para ajudar ou possibilitar a realização de um tal método pode ser incluído dentro de um kit da invenção. Os materiais auxiliares incluem um segundo membro de ligação diferente que se liga ao primeiro membro de ligação e é conjugado a um rótulo detectável (por exemplo, um rótulo fluorescente, isótopo radioativo

ou enzima). Os kits com base em anticorpo podem também compreender pérolas para conduzir uma imunoprecipitação. Cada componente dos kits está no geral no seu próprio recipiente adequado. Assim, estes kits no geral compreendem recipientes distintos adequados para cada membro de ligação. Além disso, os kits podem compreender instruções para a realização do ensaio e métodos para interpretar e analisar os dados que resultam da execução do ensaio.

A presente invenção também fornece o uso de um membro de ligação como acima para medir os níveis de antígeno em um ensaio de competição, isto quer dizer um método de medir o nível de antígeno em uma amostra pela utilização de um membro de ligação como fornecido pela presente invenção em um ensaio de competição. Isto pode ser onde a separação física de antígeno ligado do não ligado não é requerida. Ligando-se uma molécula repórter ao membro de ligação de modo que uma mudança física ou óptica ocorra na ligação é uma possibilidade. A molécula repórter pode direta ou indiretamente gerar sinais detectáveis, que podem ser quantificáveis. A ligação de moléculas repórteres pode ser direta ou indiretamente, de modo covalente, por exemplo, por intermédio de uma ligação de peptídeo ou não covalentemente. A ligação por intermédio de uma ligação de peptídeo pode ser como um resultado da expressão recombinante de uma fusão de gene que codifica anticorpo e molécula repórter.

Por exemplo, a presente invenção inclui um método de identificar um composto de ligação de IL-17, que compreende (i) imobilizar IL-17 a um suporte, (ii) contatar a dita IL-17 imobilizada simultaneamente ou em uma maneira escalonada com pelo menos um membro de ligação identificado ou rotulado de acordo com a invenção e um ou mais compostos de ligação de teste não identificado ou não rotulado e (iii) identificar um novo composto de ligação de IL-17 pela observação de uma diminuição na quantidade de identificador ligado do membro de ligação identificado.

Um método alternativo de identificar um composto de ligação de IL-17 pode compreender (i) imobilizar o membro de ligação a um suporte, (ii) contatar o dito membro de ligação imobilizado simultaneamente ou em uma maneira escalonada com IL-17 identificada e um ou mais membros de ligação ou compostos de ligação de teste não identificado ou não rotulado, (iii) identificar um novo composto de ligação de IL-17 pela observação de uma diminuição na quantidade de identificador ligado da IL-17 identificada.

Tais métodos podem ser realizado em uma maneira de alto rendimento usando um formato de multi-reservatório ou série. Tais ensaios também podem ser realizados em solução por exemplo como um ensaio de HTRF® como descrito no Exemplo 2. Ver, por exemplo, a U.S. 5.814.468, que é aqui incorporada por referência em sua totalidade. Como descrito acima, a detecção da ligação pode ser interpretada diretamente pela pessoa que realiza o método, por exemplo, observando-se visualmente um rótulo detectável ou uma diminuição na sua presença. Alternativamente, os métodos de ligação da invenção podem produzir um relato na forma de uma autorradiografia, uma fotografia, uma listagem de computador, um relato de citometria de fluxo, um gráfico, um mapa, um tubo ou recipiente ou reservatório de teste contendo o resultado ou qualquer outra representação visual ou física de um resultado do método.

Os ensaios de competição também podem ser usados no mapeamento de epítopo. Em um exemplo o mapeamento de epítopo pode ser usado para identificar a ligação do epítopo por um membro de ligação de IL-17 que opcionalmente pode ter características de neutralização e/ou modulação otimizadas. Um tal epítopo pode ser linear ou conformacional. Um epítopo conformacional pode compreender pelo menos dois fragmentos de IL-17 diferentes, em que os ditos fragmentos são posicionados em proximidade um do outro quando a IL-17 é dobrada na sua estrutura terciária ou quaternária para formar um epítopo conformacional que é reconhecido por

um inibidor de IL-17, tal como um membro de ligação de IL-17. No teste para competição um fragmento de peptídeo do antígeno pode ser utilizado, especialmente um peptídeo incluindo ou consistindo essencialmente de um epítopo de interesse. Um peptídeo tendo a seqüência de epítopo mais um ou mais aminoácidos em cada extremidade pode ser usado. Os membros de ligação de acordo com a presente invenção podem ser tais que a sua ligação ao antígeno seja inibido por um peptídeo com ou incluindo a seqüência dada.

A presente invenção fornece ainda um ácido nucleico isolado que codifica um membro de ligação da presente invenção. Os ácidos nucleicos podem incluir DNA e/ou RNA. Em um aspecto, a presente invenção fornece um ácido nucleico que codifica uma CDR ou conjunto de CDRs ou domínio VH ou domínio VL ou sítio de ligação de antígeno de anticorpo ou molécula de anticorpo, por exemplo, scFv ou IgG, por exemplo, IgG1, da invenção como definido acima.

A presente invenção também fornece construções na forma de plasmídeos, vetores, cassetes de transcrição ou expressão que compreendem pelo menos um polinucleotídeo como acima.

A presente invenção também fornece uma célula hospedeira recombinante que compreende uma ou mais construções como acima. Um ácido nucleico que codifica qualquer CDR ou conjunto de CDRs ou domínio VH ou domínio VL ou sítio de ligação de antígeno de anticorpo ou molécula de anticorpo, por exemplo, scFv ou IgG1 como fornecido, por si só forma um aspecto da presente invenção, assim como um método de produção do produto codificado, método este que compreende a expressão do ácido nucleico codificador. A expressão convenientemente pode ser obtida cultivando-se sob condições apropriadas células hospedeiras recombinantes contendo o ácido nucleico. A seguir da produção pela expressão um domínio VH ou VL ou membro de ligação podem ser isolados e/ou purificados usando qualquer técnica adequada, depois usados como apropriado.

O ácido nucleico de acordo com a presente invenção pode compreender DNA ou RNA e pode ser total ou parcialmente sintético. Referência a uma seqüência de nucleotídeo como aqui apresentada abrange uma molécula de DNA com a seqüência especificada e abrange uma molécula de RNA com a seqüência especificada em que U é substituído no lugar de T, a menos que o contexto requeira de outro modo.

Ainda um outro aspecto fornece um método de produzir um domínio variável VH de anticorpo, o método incluindo causar a expressão do ácido nucleico codificador. Um tal método pode compreender cultivar células hospedeiras sob condições para a produção do dito domínio variável VH de anticorpo.

Os métodos análogos para a produção de domínios variáveis VL e membros de ligação que compreendem um domínio VH e/ou VL são fornecidos como outros aspectos da presente invenção.

Um método de produção pode compreender uma etapa de isolação e/ou purificação do produto. Um método de produção pode compreender formular o produto em uma composição incluindo pelo menos um componente adicional, tal como um excipiente farmaceuticamente aceitável.

Sistemas para clonar e expressar um polipeptídeo em uma variedade de células hospedeiras diferentes são bem conhecidos. As células hospedeiras adequadas incluem bactérias, células de mamífero, células vegetais, fungos filamentosos, levedura e sistemas de baculovírus e plantas transgênicas e animais. A expressão de anticorpos e fragmentos de anticorpo em células procarióticas é bem estabelecida na técnica. Para uma revisão, ver por exemplo Plückthun 1991. Um hospedeiro bacteriano comum é a *E. coli*.

A expressão em células eucarióticas em cultura também está disponível para aqueles habilitados na técnica como uma opção para a produção de um membro de ligação por exemplo Chadd & Chamow (2001),

Andersen & Krummen (2002), Larrick & Thomas (2001). As linhagens de célula de mamífero disponíveis na técnica para a expressão de um polipeptídeo heterólogo incluem as células do ovário do hamster chinês (CHO), células HeLa, células renais do hamster bebê, células de melanoma de camundongo NSO, células de mieloma de rato YB2/0, células renais embrionárias humanas, células da retina embrionária humana e muitas outras.

Os vetores adequados podem ser escolhidos ou construídos, contendo seqüências regulatórias apropriadas, incluindo seqüências promotoras, seqüências terminadoras, seqüências de poliadenilação, seqüências realçadoras, genes marcadores e outras seqüências como apropriado. Os vetores podem ser plasmídeos por exemplo, fagomídeo ou viral por exemplo, 'fago, como apropriado. Para mais detalhes ver, por exemplo, Sambrook & Russell (2001). Muitas técnicas e protocolos conhecidos para a manipulação de ácido nucleico, por exemplo na preparação de construções de ácido nucleico, mutagênese, seqüenciamento, introdução de DNA em células e expressão de gene e análise de proteínas, são descritas em detalhes em Ausubel 1999.

Um outro aspecto da presente invenção fornece uma célula hospedeira contendo ácido nucleico como aqui divulgado. Uma tal célula hospedeira pode ser *in vitro* e pode ser em cultura. Uma tal célula hospedeira pode ser *in vivo*. A presença *in vivo* da célula hospedeira pode permitir a expressão intracelular dos membros de ligação da presente invenção como "intracorpos" ou anticorpos intracelulares. Intracorpos podem ser usados para a terapia de gene.

Ainda um outro aspecto fornece um método que compreende introduzir ácido nucleico da invenção em uma célula hospedeira. A introdução pode utilizar qualquer técnica disponível. Para as células eucarióticas, técnicas adequadas podem incluem a transfecção com fosfato de cálcio, DEAE-Dextrano, eletroporação, transfecção mediada com lipossoma e

transdução usando retrovírus ou outros vírus, por exemplo, varíola ou, para as células de inseto, baculovírus. A introdução de ácido nucleico na célula hospedeira, em particular uma célula eucariótica pode usar um sistema viral ou um com base em plasmídeo. O sistema de plasmídeo pode ser mantido epissomicamente ou pode ser incorporado na célula hospedeira ou em um cromossoma artificial. A incorporação pode ser pela integração aleatória ou alvejada de uma ou mais cópias nos locais únicos ou múltiplos. Para as células bacterianas, as técnicas adequadas podem incluir a transformação com cloreto de cálcio, eletroporação e transfecção usando bacteriófago.

A introdução pode ser seguida causando ou permitindo-se a expressão do ácido nucleico, por exemplo, pelo cultivo de células hospedeiras sob condições para a expressão do gene. A purificação do produto expressado pode ser obtida pelos métodos conhecidos por uma pessoa de habilidade na técnica.

Em uma forma de realização, o ácido nucleico da invenção é integrado no genoma (por exemplo, cromossoma) da célula hospedeira. A integração pode ser promovida pela inclusão de seqüências que promovam a recombinação com o genoma, de acordo com técnicas padrão.

A presente invenção também fornece um método que compreende usar uma construção como estabelecida acima em um sistema de expressão de modo a expressar um membro de ligação ou polipeptídeo como acima.

Os membros de ligação da presente invenção são planejados para serem usados nos métodos de diagnóstico ou tratamento em pacientes humanos ou animais, por exemplo, humanos. Por exemplo, os membros de ligação podem ser usados no diagnóstico ou tratamento de doenças ou distúrbios associados com IL-17, os exemplos dos quais são aqui aludidos em outro lugar.

Outros exemplos de condições para as quais um membro de

ligação da invenção pode ser usado no tratamento ou diagnóstico incluem:

1. Trato respiratório: doenças obstrutivas das vias aéreas incluindo: asma, incluindo a asma brônquica, alérgica, intrínseca, extrínseca, induzida por exercício, induzida por medicamento (incluindo aspirina e induzida por NSAID) e induzida por poeira, tanto intermitente quanto persistente e de todas as gravidades e outras causas de hiper-responsividade das vias aéreas; doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD); bronquite, incluindo a bronquite infecciosa e eosinofílica; enfisema; bronquiectasia; fibrose cística; sarcoidose; pulmão do fazendeiro e doenças relacionadas; pneumonite de hipersensibilidade; fibrose pulmonar, incluindo alveolite fibrosante criptogênica, pneumonias intersticiais idiopáticas, fibrose que complica a terapia anti-neoplástica e infecção crônica, incluindo tuberculose e aspergilose e outras infecções fúngicas; complicações de transplante pulmonar; distúrbios vasculíticos e trombóticos da vasculatura pulmonar e hipertensão pulmonar; atividade antitussiva incluindo tratamento de tosse crônica associada com condições inflamatórias e secretoras das vias aéreas e tosse iatrogênica; rinite aguda e crônica incluindo rinite medicamentosa e rinite vasomotora; rinite alérgica perene e sazonal incluindo rinite nervosa (febre do feno); polipose nasal; infecção viral aguda incluindo o resfriado comum e infecção devido ao vírus sincicial respiratório, influenza, coronavírus (incluindo SARS) e adenovírus;

2. Osso e juntas: artrites associadas com ou incluindo osteoartrite/ osteoartrose, tanto primárias quanto secundárias, por exemplo, displasia de quadril congênita; espondilite cervical e lombar e dor na região lombar e pescoço; artrite reumatóide e doença de Still; espondiloartropatias soronegativas incluindo espondilite ancilosante, artrite psoriática, artrite reativa e espondartropatia não diferenciada; artrite séptica e outras artropatias relacionadas com a infecção e distúrbios ósseos tais como tuberculose, incluindo doença de Potts e síndrome de Poncet; sinovite induzida por cristal

aguda e crônica incluindo gota de urato, doença de deposição de pirofosfato de cálcio e inflamação de tendão, bursal e sinovial relacionada com apatita cálcica; doença de Behcet; síndrome de Sjogren primária e secundária; esclerose sistêmica e escleroderma limitada; lupo eritematoso sistêmico, doença do tecido conectivo misto e doença do tecido conectivo não diferenciado; miopatias inflamatórias incluindo dermatomiosites e polimiosites; polimialgia reumática; artrite juvenil incluindo artrites inflamatórias idiopáticas de distribuição em qualquer junta e síndromes associadas e febre reumática e suas complicações sistêmicas; vasculites incluindo arterite de célula gigante, arterite de Takayasu, síndrome de Churg-Strauss, poliarterite nodosa, poliarterite microscópica e vasculites associadas com infecção viral, reações de hipersensibilidade, crioglobulinas e paraproteínas; dor na região lombar; Febre do mediterrâneo familiar, síndrome de Muckle-Wells e Febre Hibernal Familiar, doença de Kikuchi; artalgias induzidas por medicamento, tendinites e miopatias;

3. Dor e remodelagem do tecido conectivo de distúrbios musculoesqueletais devido a lesão, por exemplo lesão esportiva ou doença: artrites (por exemplo artrite reumatóide, osteoartrite, gota ou artropatia cristalina), outra doença de junta (tal como degeneração do disco intervertebral ou degeneração de junta temporomandibular), doença de remodelagem óssea (tal como osteoporose, doença de Paget ou osteonecrose), policondrites, escleroderma, distúrbio do tecido conectivo misto, espondiloartropatias ou doença periodontal (tal como periodontite);

4. Pele: psoríase, dermatite atópica, dermatite de contato ou outras dermatoses eczematosa e reações de hipersensiblidade do tipo demorado; fito- e foto-dermatite; dermatite seborréica, dermatite herpetiforme, líquen plano, líquen escleroso e atrófico, pioderma gangrenosa, sarcóide de pele, lupo eritematoso discóide, pênfigo, penfigoide, epidermólise bolhosa, urticária, angioedema, vasculite, eritemas, eosinofilias cutâneas,

alopecia areata, calvice de padrão masculino, síndrome de Sweet, síndrome de Weber-Christian, eritema multiforme; celulite, tanto infectiva quanto não infectiva; paniculite; linfomas cutâneos, câncer de pele não melanoma e outras lesões displásticas; distúrbios induzidos por medicamento incluindo erupções de medicamento fixo;

5. Olhos: blefarite; conjuntivite, incluindo conjuntivite alérgica perene e vernal; irite; uveíte anterior e posterior; coroidite; autoimune; distúrbio degenerativos ou inflamatórios que afetam a retina; oftalmite incluindo oftalmite simpática; sarcoidose; infecções incluindo virais, fúngicas e bacterianas;

6. Trato Gastrointestinal: glossite, gengivite, periodontite; oesofagite, incluindo refluxo; gastroenterite eosinofílica, mastocitose, doença de Crohn, colite por exemplo, colite ulcerativa, colite indeterminante, proctite, colite microscópica, prurido anal; doença celíaca, síndrome do intestino irritável, síndrome do intestino irritável, diarréia não inflamatória e alergias relacionadas com alimento que podem ter efeitos remotos do intestino (por exemplo enxaqueca, rinite ou eczema);

7. Abdominal: hepatite, incluindo autoimune, alcoólica e viral; fibrose e cirrose do fígado; colecistite; pancreatite, tanto aguda quanto crônica;

8. Genitourinário: nefrite incluindo intersticial e glomerulonefrite; síndrome nefrótica; cistite incluindo cistite aguda e crônica (intersticial) e úlcera de Hunner; uretrite aguda e crônica, prostatite, epididimite, ooforite e salpingite; vulvo-vaginite; doença de Peyronie; disfunção erétil (tanto masculina quanto feminina);

9. Rejeição de aloenxerto: aguda e crônica a seguir, por exemplo, de transplante de rim, coração, fígado, pulmão, medula óssea, pele ou córnea ou a seguir da transfusão de sangue; ou doença do enxerto versus hospedeiro crônica;

10. CNS: mal de Alzheimer e outros distúrbios que causam demência incluindo CJD e nvCJD; amiloidose; esclerose múltipla e outras síndromes desmielinantes; aterosclerose cerebral e vasculite; arterite temporal; miastenia grave; dor aguda e crônica (aguda, intermitente ou persistente, seja de origem central ou periférica) incluindo dor visceral, dor de cabeça, enxaqueca, neuralgia trigeminal, dor facial atípica, dor de junta e óssea, dor que surge do câncer e invasão de tumor, síndromes de dor neuropática incluindo neuropatias diabéticas, pós herpética e associadas com o HIV; neurossarcoidose; complicações do sistema nervoso central e periférico de processos malignos, infecciosos ou autoimunes;

11. Outros distúrbios autoimunes e alérgicos incluindo tireoidite de Hashimoto, doença de Graves, doença de Addison, diabete melito, púrpura troombocitopênica idiopática, fasciíte eosinofílica, síndrome de hiperIgE, síndrome antifosfolipídica;

12. Outros distúrbios com um componente inflamatório ou imunológico; incluindo a síndrome da deficiência imune adquirida (AIDS), lepra, síndrome de Sezary e síndromes paraneoplásticas;

13. Cardiovascular: aterosclerose, que afeta a circulação coronária e periférica; pericardite; miocardite, cardiomiopatias inflamatórias e autoimunes incluindo sarcóide miocárdico; lesões de reperfusão isquêmica; endocardite, valvulite e aortite incluindo infectiva (por exemplo sifilítica); vasculites; distúrbios das veias próximas e periféricas incluindo flebite e trombose, incluindo trombose de veia profunda e complicações de veias varicosas; e

14. Oncologia: tratamento de cânceres comuns incluindo tumores da próstata, mama, pulmão, ovariano, pancreático, intestino e cólon, estômago, pele e cérebro e malignidades que afetam a medula óssea (incluindo as leucemias) e sistemas linfoproliferativos, tais como linfomas de Hodgkin e não Hodgkin; incluindo a prevenção e tratamento de doenças

metastáticas e reocorrências de tumor e síndromes paraneoplásticas.

Assim, os membros de ligação da invenção são úteis como agentes terapêuticos no tratamento de condições que envolvem a expressão e/ou atividade de IL-17 aberrante. Uma forma de realização, entre outras, é um método de tratamento que compreende administrar uma quantidade eficaz de um membro de ligação da invenção a um paciente em necessidade desta, em que a expressão e/ou atividade de IL-17 aberrantes é diminuída. Uma outra forma de realização, entre outras, é um método de tratamento que compreende (i) identificar um paciente que demonstra níveis ou atividade de IL-17 aberrantes, por exemplo, usando os métodos de diagnóstico descritos acima e (ii) administrar uma quantidade eficaz de um membro de ligação da invenção ao paciente, em que a expressão e/ou atividade de IL-17 aberrantes são diminuídas. Uma quantidade eficaz de acordo com a invenção é uma quantidade que diminui a expressão e/ou atividade de IL-17 aberrante de modo a diminuir ou reduzir a gravidade de pelo menos um sintoma da doença ou distúrbio particular que são tratados, mas não necessariamente curar a doença ou distúrbio. Conseqüentemente, uma forma de realização da invenção é um método de tratar ou reduzir a severidade de pelo menos um sintoma de qualquer um dos distúrbios aqui aludidos, que compreende administrar a um paciente em necessidade deste uma quantidade eficaz de um ou mais membros de ligação da presente invenção sozinhos ou em um regime terapêutico combinado com um outro medicamento apropriado conhecido na técnica ou aqui descrito tal que a severidade de pelo menos um sintoma de qualquer um dos distúrbios seja reduzido. Uma outra forma de realização da invenção, entre outras, é um método de antagonizar pelo menos um efeito de IL-17 que compreende contatar ou administrar uma quantidade eficaz de um ou mais membros de ligação da presente invenção tal que o dito pelo menos um efeito de IL-17 seja antagonizado, por exemplo, ligação de IL-17 à IL-17RA ou efeitos a jusante tais como a liberação de citocina.

Conseqüentemente, outros aspectos da invenção fornecem métodos de tratamento que compreendem a administração de um membro de ligação como fornecido, composições farmacêuticas que compreendem um tal membro de ligação e o uso de um tal membro de ligação na fabricação de um medicamento para a administração, por exemplo em um método de fabricar um medicamento ou composição farmacêutica que compreende formular o membro de ligação com um excipiente farmaceuticamente aceitável. Um excipiente farmaceuticamente aceitável pode ser um composto ou uma combinação de compostos que entram em uma composição farmacêutica que não provoquem reações secundárias e que permitem, por exemplo, a facilitação da administração do(s) composto(s) ativo(s), um aumento no seu período de vida e/ou na sua eficácia no corpo, um aumento na sua solubilidade em solução ou ainda uma melhora na sua conservação. Estes veículos farmaceuticamente aceitáveis são bem conhecidos e serão adaptados pela pessoa habilitada na técnica como uma função da natureza e do modo de administração do(s) composto(s) ativo(s) escolhido(s).

Os membros de ligação da presente invenção usualmente serão administrados na forma de uma composição farmacêutica, que pode compreender pelo menos um componente além do membro de ligação. Assim as composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção e para o uso de acordo com a presente invenção, podem compreender, além do ingrediente ativo, um excipiente, carregador, tampão, estabilizador ou outros materiais farmaceuticamente aceitáveis bem conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Tais materiais devem ser não tóxico e não devem interferir com a eficácia do ingrediente ativo. A natureza exata do carregador ou outro material dependerá da via de administração, que pode ser oral, inalada ou por injeção, por exemplo, intravenosa.

As composições farmacêuticas para a administração oral tais como por exemplo nanocorpos etc também são considerados na presente

invenção. Tais formulações orais podem estar na forma de tablete, cápsula, pó, líquida ou semi-sólida. Um tablete pode compreender um carregador sólido tal como gelatina ou um adjuvante. As composições farmacêuticas líquidas no geral compreendem um carregador líquido tal como água, petróleo, óleos animais ou vegetais, óleo mineral ou óleo sintético. A solução salina fisiológica, dextrose ou outra solução de sacarídeo ou glicóis tais como etileno glicol, propileno glicol ou polietileno glicol podem ser incluídas.

Para a injeção intravenosa ou injeção no sítio de aflição, o ingrediente ativo estará na forma de uma solução aquosa parenteralmente aceitável que seja isenta de pirogênio e tenha pH, isotonicidade e estabilidade adequados. Aqueles de habilidade relevante na técnica são bem capazes de preparar soluções adequadas usando, por exemplo, veículos isotônicos tais como Injeção de Cloreto de Sódio, Injeção de Ringer, Injeção de Ringer Lactada. Conservantes, estabilizantes, tampões, antioxidantes e/ou outros aditivos podem ser utilizados, como requeridos, incluindo tampões tais como fosfato, citrato, histidina e outros ácidos orgânicos; antioxidantes tais como ácido ascórbico e metionina; conservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquil parabenos tais como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; cicloexanol; 3'- pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de peso molecular baixo; proteínas tais como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparaginas, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes queladores tais como EDTA; açúcares tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íons formadores de sal tais como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos de Zn-proteína); e/ou tensoativos não iônicos tais como TWEEN®, PLURONICS® ou polietileno

glicol (PEG).

Os membros de ligação da presente invenção podem ser formulados nas formas líquidas, semi-sólidas ou sólidas dependendo nas propriedades físico-químicas da molécula e da via de liberação. As formulações podem incluir excipientes ou combinações de excipientes, por exemplo: açúcares, aminoácidos e tensoativos. As formulações líquidas podem incluir uma ampla faixa de concentrações de anticorpo e pH. As formulações sólidas podem ser produzidas pela liofilização, secagem por pulverização ou secagem pela tecnologia de fluido supercrítico, por exemplo. As formulações anti-IL-17 dependerão da via pretendida de liberação: por exemplo, formulações para a liberação pulmonar pode consistir de partículas com propriedades físicas que garantem a penetração no pulmão profundo na inalação; as formulações tópicas podem incluir agentes modificadores de viscosidade, que prolongam o tempo que o medicamento é residente no sítio de ação. Em certas formas de realização, o membro de ligação pode ser preparado com um carregador que protegerá o membro de ligação contra a liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastros transdérmicos e sistemas de liberação microencapsulados. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados, tais como etileno acetato de vinila, polianidretos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido poliláctico. Muitos métodos para a preparação de tais formulações são conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Ver, por exemplo, Robinson, 1978.

O tratamento anti-IL-17 com um membro de ligação da invenção pode ser dado oralmente (por exemplo nanocorpos) pela injeção (por exemplo, subcutaneamente, intra-articular, intravenosamente, intraperitoneal, intra-arterial ou intramuscularmente), por inalação, pela via intravesicular (instilação na bexiga urinária) ou topicamente (por exemplo intraocular, intranasal, retal, nos ferimentos, na pele). O tratamento pode ser

administrado pela infusão de pulso, particularmente com doses declinantes do membro de ligação. A via de administração pode ser determinada pelas características físico-químicas do tratamento, pelas considerações especiais para a doença ou pela exigência para otimizar a eficácia ou para minimizar efeitos colaterais. Uma via particular de administração é a intravenosa. Uma outra via de administrar as composições farmacêuticas da presente invenção é subcutaneamente. É considerado que o tratamento anti-IL-17 não será restrito ao uso na clínica. Portanto, a injeção subcutânea usando um dispositivo isento de agulha é vantajoso.

Uma composição pode ser administrada sozinha ou em combinação com outros tratamentos, concorrente ou seqüencialmente ou como um preparação combinada com um outro agente ou agentes terapêuticos, dependendo da condição a ser tratada.

Um membro de ligação para IL-17 pode ser usado como parte de uma terapia de combinação em conjunção com um componente medicinal adicional. Os tratamentos de combinação podem ser usados para fornecer efeitos sinergísticos significantes, particularmente a combinação de um membro de ligação anti-IL-17 com um ou mais outros medicamentos. Um membro de ligação para IL-17 pode ser administrado concorrentemente ou seqüencialmente ou como uma preparação combinada com um outro agente ou agentes terapêuticos, para o tratamento de uma ou mais das condições aqui listadas.

Um membro de ligação de acordo com a presente invenção pode ser fornecido em combinação ou adição com um ou mais dos seguintes agentes:

- um antagonista da função de citocina, (por exemplo, um agente que atua nos caminhos da sinalização de citocina tal como um modulador do sistema SOCS), tal como um interferon alfa, beta e/ou gama; moduladores do fator de crescimento tipo I (IGF-1) equivalente à insulina,

seus receptores e proteínas de ligação associadas; interleucinas (IL) por exemplo, um ou mais de IL-1 a 33 e/ou um antagonista ou inibidor de interleucina tal como anaquinra; inibidores de receptores de membros da família da interleucina ou inibidores de subunidades específicas de tais receptores; um inibidor do fator alfa de necrose de tumor (TNF-α) tal como um anticorpo anti-TNF monoclonal (por exemplo infliximab; adalimumab e/ou CDP-870), e/ou um antagonista do receptor de TNF por exemplo, uma molécula de imunoglobulina (tal como etanercept) e/ou um agente de peso molecular baixo tal como pentoxifilina;

- um modulador de células B, por exemplo, um anticorpo monoclonal que alveja linfócitos B (tais como CD20 (rituximab) ou MRA-aIL16R) ou linfócitos T (por exemplo, CTLA4-Ig, Humax 11-15 ou Abatacept);

- um modulador que inibe a atividade de osteoclasto, por exemplo um anticorpo para RANKL;

- um modulador de quimiocina ou função receptora de quimiocina tal como um antagonista de CCR1, CCR2, CCR2A, CCR2B, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 e CCR11 (para a família C-C); CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 e CXCR5 e CXCR6 (para a família C-X-C) e CX_3CR1 para a família C-X_3-C;

- um inibidor de metaloproteases de matriz (MMPs), isto é, uma ou mais das estromelisinas, as colagenases e as gelatinases, assim como agrecanase; especialmente colagenase-1 (MMP1), colagenase-2 (MMP8), colagenase-3 (MMP13), estromelisina-1 (MMP3), estromelisina-2 (MMP10) e/ou estromelisina-3 (MMP11) e/ou MMP9 e/ou MMP12, por exemplo, um agente tal como doxiciclina;

- um inibidor da biossíntese de leucotrieno, inibidor da 5-lipoxigenase (5-LO) ou antagonista da proteína ativadora da 5-lipoxigenase (FLAP) tal como; zileuton; ABT-761; fenleuton; tepoxalin; Abbott-79175;

Abbott-85761; N-(5-substituída)-tiofeno-2-alquilsulfonamidas; 2,6-di-terc-butilfenolidrazonas; metoxitetraidropiranos tais como Zeneca ZD2138; o composto SB-210661; um composto de 2-cianonaftaleno substituído por piridinila tal como L-739.010; um composto 2-cianoquinolina tal como L-746.530; indol e/ou um composto de quinolino tal como MK-591, MK-886 e/ou BAY x 1005;

- um antagonista do receptor para leucotrienos (LT) B4, LTC4, LTD4 e LTE4, selecionado do grupo que consiste dos fenotiazin-3-ilas tais como L-651.392; compostos de amidino tais como CGS-25019c; benzoxalaminas tais como ontazolast; benzenocarboximidamidas tais como BIIL 284/260; e compostos tais como zafirlukast, ablukast, montelukast, pranlukast, verlukast (MK-679), RG-12525, Ro-245913, iralukast (CGP 45715A) e BAY x 7195;

- um inibidor da fosfodiesterase (PDE) tal como uma metilxantanina, por exemplo, teofilina e/ou aminofilina; e/ou um inibidor da isoenzima de PDE seletivo por exemplo, um inibidor de PDE4 e/ou inibidor da isoforma PDE4D e/ou um inibidor de PDE5;

- um antagonista do receptor de histamina tipo 1 tal como cetirizina, loratadina, desloratadina, fexofenadina, acrivastina, terfenadina, astemizol, azelastina, levocabastina, clorfeniramina, prometazina, ciclizina e/ou mizolastina (no geral oral, tópico ou parenteralmente aplicado);

- um inibidor da bomba de próton (tal como omeprazol) ou antagonista do receptor da histamina tipo 2 gastroprotetivo;

- um antagonista do receptor de histamina tipo 4;

- um agente simpatomimético vasoconstritor do agonista adrenoceptor alfa-1/alfa-2, tal como propilexedrina, fenilefrina, fenilpropanolamina, efedrina, pseudoefedrina, cloridreto de nafazolina, cloridreto de oximetazolina, cloridreto de tetraidrozolina, cloridreto de xilometazolina, cloridreto de tramazolina e cloridreto de etilnorrepinefrina;

- um agente anticolinérgico, por exemplo, um antagonista do receptor muscarínico (M1, M2 e M3) tal como atropina, hioscina, glicopirrrolato, brometo de ipratrópio, brometo de tiotrópio, brometo de oxitrópio, pirenzepina e telenzepina;

- um agonista beta-adrenoceptor (incluindo beta receptor subtipos 1 a 4) tal como isoprenalina, salbutamol, formoterol, salmeterol, terbutalina, orciprenalina, mesilato de bitolterol e/ou pirbuterol, por exemplo, um enanciômero quiral destes;

- um cromona, por exemplo, cromoglicato de sódio e/ou nedocromil sódico;

- um glicocorticóide, tal como flunisolida, triancinolona acetonida, dipropionato de beclometasona, budesonida, propionato de fluticasona, ciclesonida e/ou furoato de mometasona;

- um agente que modula receptores de hormônio nuclear tal como um PPAR;

- uma preparação de imunoglobulina (Ig) ou Ig ou um antagonista ou anticorpo que modula a função Ig tal como anti-IgE (por exemplo, omalizumab);

- outro agente antiinflamatório sistêmica ou topicamente aplicado, por exemplo, talidomida ou um derivado desta, um retinóide, ditranol e/ou calcipotriol;

- combinações de aminossalicilatos e sulfapiridina tal como sulfasalazina, mesalazina, balsalazida e olsalazina; e agentes imunomoduladores tais como as tiopurinas e corticosteróides tais como budesonida;

- um agente antibacteriano por exemplo, um derivado de penicilina, uma tetraciclina, um macrolídeo, uma beta-lactama, uma fluoroquinolona, metronidazol e/ou um aminoglicosídeo inalado; e/ou um agente antiviral por exemplo, aciclovir, fanciclovir, valaciclovir, ganciclovir,

cidofovir; amantadina, rimantadina; ribavirina; zanamavir e/ou oseltamavir; um inibidor da protease tal como indinavir, nelfinavir, ritonavir e/ou saquinavir; um inibidor da transcriptase reversa de nucleosídeo tal como didanosina, lamivudina, estavudina, zalcitabina, zidovudina; um inibidor da transcriptase reversa não nucleosídica tal como nevirapina, efavirenz;

- um agente cardiovascular tal como um bloqueador do canal de cálcio, bloqueador beta-adrenoceptor, inibidor da enzima que converte a angiotensina (ACE), antagonista do receptor da angiotensina-2; agente que diminui lipídeo tal como uma estatina e/ou fibrato; um modulador da morfologia de célula sangüínea tal como pentoxifilina; um trombolítico e/ou um anticoagulante por exemplo, um inibidor da agregação de plaqueta;

- um agente do CNS tal como um antidepressivo (tal como sertralina), medicamento anti-Parquinsoniano (tal como deprenil, L-dopa, ropinirol, pramipexol, inibidor de MAOB tal como selegina e rasagilina, inibidor de comP tal como tasmar, inibidor A-2, inibidor da recaptação de dopamina, antagonista de NMDA, agonista de nicotina, agonista de dopamina e/ou inibidor da óxido nítrico sintase neuronal) e um medicamento anti-Alzheimer tal como donepezil, rivastigmina, tacrina, inibidor de COX-2, propentofilina ou metrifonato;

- um agente para o tratamento da dor aguda e crônica, por exemplo, um analgésico que atua central ou perifericamente tal como um análogo ou derivado de opióide, carbamazepina, fenitoína, valproato de sódio, amitriptilina ou outro agente antidepressivo, paracetamol ou agente anti-inflamatório não esteroidal;

- um agente anestésico local parenteral ou topicamente aplicado (incluindo inalado) tal como lignocaína ou um análogo deste;

- um agente anti-osteoporose por exemplo, um agente hormonal tal como raloxifeno ou um bifosfonato tal como alendronato;

- (i) um inibidor da triptase; (ii) um antagonista do fator

ativador de plaqueta (PAF); (iii) um inibidor da enzima que converte a interleucina (ICE); (iv) um inibidor de IMPDH; (v) um inibidor da molécula de adesão incluindo antagonista VLA-4; (vi) uma catepsina; (vii) um inibidor da quinase por exemplo, um inibidor de tirosina quinases (tais como Btk, Itk, Jak3 MAP, os exemplos de inibidores podem incluir Gefitinib, mesilato de Imatinib), uma serina / treonina quinase (por exemplo, um inibidor da MAP quinase tal como p38, JNK, proteína quinases A, B e C e IKK) ou uma quinase envolvida na regulagem do ciclo celular (por exemplo, uma quinase dependente de cilina); (viii) um inibidor da glicose-6 fosfato desidrogenase; (ix) um antagonista do receptor de quinina-B_1 e/ou B_2; (x) um agente anti-gota, por exemplo, colchicina; (xi) um inibidor da xantina oxidase, por exemplo, alopurinol; (xii) um agente uricossúrico, por exemplo, probenecid, sulfinpirazona e/ou benzbromarona; (xiii) um secretagogo do hormônio do crescimento; (xiv) fator de crescimento transformador (TGFP); (xv) fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); (xvi) fator de crescimento de fibroblasto, por exemplo, fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF); (xvii) fator estimulador de colônia de granulócito macrófago (GM-CSF); (xviii) creme de capsaicina; (xix) um antagonista do receptor de taquicinina NK_1 e/ou NK_3 tal NKP-608C, SB-233412 (talnetant) e/ou D-4418; (xx) um inibidor da elastase por exemplo, UT-77 e/ou ZD-0892; (xxi) um inibidor da enzima que converte TNF-alfa (TACE); (xxii) inibidor da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) ou (xxiii) uma molécula homóloga do receptor quimioatraente expressada em células TH2, (tal como um antagonista de CRTH2) (xxiv) um inibidor de um P38 (xxv) agente que modula a função de receptores equivalentes a Toll (TLR) e (xxvi) um agente que modula a atividade de receptores purinérgicos tais como P2X7; (xxvii) um inibidor da ativação do fator de transcrição tal como NFkB, API e/ou STATS.

Um inibidor pode ser específico ou pode ser um inibidor misto, por exemplo, um inibidor que alveje mais do que uma das moléculas

(por exemplo, receptores) ou classes moleculares mencionadas acima.

O membro de ligação também pode ser usado em associação com um agente quimioterapêutico ou um outro inibidor da tirosina quinase em co-administração ou na forma de um imunoconjugado. Fragmentos do dito anticorpo também podem ser usados em anticorpos biespecíficos obtidos pelos mecanismos recombinantes ou ligação bioquímica e depois associando a especificidade do anticorpo acima descrito com a especificidade de outros anticorpos capazes de reconhecer outras moléculas envolvidas na atividade para a qual a IL-17 está associada.

Para o tratamento de uma doença inflamatória, um membro de ligação da invenção pode ser combinado com um ou mais agentes tais como: agentes antiinflamatórios não esteroidais (a seguir NSAIDs) incluindo os inibidores da ciclooxigenase não seletivo (COX)-1 / COX-2 sejam aplicados tópica ou sistemicamente (tais como piroxicam, diclofenaco, ácidos propiônicos tais como naproxen, flurbiprofen, fenoprofen, cetoprofen e ibuprofen, fenamatos tais como ácido mefenâmico, indometacina, sulindac, azapropazona, pirazolonas tais como fenilbutazona, salicilatos tais como aspirina); inibidores de COX-2 seletivos (tais como meloxicam, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, lumarocoxib, parecoxib e etoricoxib); doadores de óxido nítrico que inibem a ciclooxigenase (CINODs); glicocorticosteróides (sejam administrados pelas vias tópica, oral, intramuscular, intravenosa ou intraarticular); metotrexato, leflunomida; hidroxicloroquina, d-penicilamina, auranofin ou outras preparações de ouro parenteral ou oral; analgésicos; diacereína; terapias intra-articulares tais como derivados do ácido hialurônico; e suplementos nutricionais tais como glicosamina.

Um membro de ligação da invenção também pode ser usado em combinação com um agente terapêutico existente para o tratamento de câncer. Os agentes adequados a serem usados em combinação incluem:

(i) medicamentos antiproliferativos/antineoplásticos e

combinações destes, como usado na oncologia médica, tal como agentes de alquilação (por exemplo cis-platina, carboplatina, ciclofosfamida, mostarda nitrogenada, melfalan, clorambucil, busulfan e nitrosouréias); antimetabólitos (por exemplo antifoliatos tais como fluoropirimidinas como 5-fluorouracila e tegafur, raltitrexed, metotrexato, citosina arabinosida, hidroxiuréia, gencitabina e paclitaxel; antibióticos antitumor (por exemplo antraciclinas como adriamicina, bleomicina, doxorrubicina, daunomicina, epirrubicina, idarrubicina, mitomicina-C, dactinomicina e mitramicina); agentes antimitóticos (por exemplo alcalóides vinca como vincristina, vinblastina, vindesina e vinorrelbina e taxóides como taxol e taxotere); e inibidores da topoisomerase (por exemplo epipodofilotoxinas como etoposida e teniposida, ansacrina, topotecano e camptotecinas);

(ii) agentes citostáticos tais como antiestrogênios (por exemplo tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno e iodoxifeno), infra reguladores do receptor de estrogênio (por exemplo fulvestrant), antiandrogênios (por exemplo bicalutamida, flutamida, nilutamida e acetato de ciproterona), antagonistas de LHRH ou agonistas de LHRH (por exemplo goserelina, leuprorelina e buserelina), progestogênios (por exemplo acetato de megestrol), inibidores de aromatase (por exemplo como anastrozol, letrozol, vorazol e exemestano) e inibidores de 5α-redutase tais como finasterida;

(iii) Agentes que inibem a invasão de célula cancerosa (por exemplo inibidores da metaloproteinase como marimastat e inibidores da função receptora do ativador de plasminogênio da uroquinase);

(iv) inibidores da função do fator de crescimento, por exemplo tais inibidores incluem anticorpos do fator de crescimento, anticorpos do receptor do fator de crescimento (por exemplo o anticorpo anti-erbb2 trastuzumab e o anticorpo anti-erbbl cetuximab [0225]), inibidores da farnesil transferase, inibidores da tirosina quinase e inibidores da serina/treonina quinase, por exemplo inibidores da família do fator de crescimento

epidérmico (por exemplo inibidores da tirosina quinase da família de EGFR tais como N(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metóxi-6-(3-morfolinopropóxi) quinazolin-4-amina (gefitinib, AZD1839), N-(3- etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietóxi)quinazolin-4-amina (erlotinib, OSI-774) e 6-acrilamido-N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3- morfolinopropóxi) quinazolin-4-amina (CI 1033)), por exemplo inibidores da família do fator de crescimento derivado de plaqueta e por exemplo inibidores da família do fator de crescimento de hepatócito;

(v) agentes antiangiogênicos tais como aqueles que inibem os efeitos do fator de crescimento endotelial vascular, (por exemplo o anticorpo anti-fator de crescimento de célula endotelial vascular bevacizumab, compostos tais como aqueles divulgados nos pedidos de Patente Internacional WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 e WO 98/13354, cada um dos quais é aqui incorporado em sua totalidade) e compostos que funcionam por outros mecanismos (por exemplo linomida, inibidores da função da integrina $\alpha v\beta 3$ e angiostatina);

(vi) agentes de dano vascular tais como combretastatina A4 e compostos divulgados nos Pedidos de Patente Internacional WO 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 e WO 02/08213, cada um dos quais é aqui incorporado em sua totalidade;

(vii) terapias de anti-sentido, por exemplo aquelas que são direcionadas aos alvos listados acima, tais como ISIS 2503, um anti-sentido anti-ras;

(viii) métodos de terapia de gene, incluindo por exemplo métodos para substituir genes aberrantes tais como p53 aberrante ou BRCA1 ou BRCA2 aberrante, métodos GDEPT (terapia de pró medicamento de enzima direcionada ao gene) tais como aqueles usando citosina desaminase, timidina quinase ou uma enzima da nitrorredutase bacteriana e métodos para aumentar a tolerância do paciente á quimioterapia ou radioterapia tais como a

terapia de gene de resistência a medicamento múltiplo; e

(ix) métodos imunoterapêuticos, incluindo por exemplo métodos *ex vivo* e *in vivo* para aumentar a imunogenicidade das células de tumor do paciente, tais como a transfecção com citocinas tais como interleucina 2, interleucina 4 ou fator estimulador de colônia de granulócito macrófago, métodos para a diminuição da anergia de célula T, métodos usando células imunes transfectadas tais como células dendríticas transfectadas com citocina, métodos usando linhagens de célula de tumor transfectadas com citocina e métodos usando anticorpos anti-idiotípicos.

Um membro de ligação da invenção e um ou mais dos componentes medicinais adicionais acima podem ser usados na fabricação de um medicamento. O medicamento pode ser para a administração separada ou combinada a um indivíduo e conseqüentemente pode compreender o membro de ligação e o componente adicional como uma preparação combinada ou como preparações separadas. As preparações separadas podem ser usadas para facilitar a administração separada e seqüencial ou simultânea e permitir a administração dos componentes pelas vias diferentes por exemplo, administração oral e parenteral.

De acordo com a presente invenção, as composições fornecidas podem ser administradas aos mamíferos. A administração pode ser em uma "quantidade terapeuticamente eficaz", esta sendo suficiente para mostrar benefício a um paciente. Tal benefício pode ser pelo menos a melhora de pelo menos um sintoma. A quantidade real administrada e a taxa e o curso de tempo de administração, dependerá da natureza e severidade do que está sendo tratado, do mamífero particular que é tratado, da condição clínica do paciente individual, da causa do distúrbio, do sítio de liberação da composição, do tipo de membro de ligação, do método de administração, do programa de administração e outros fatores conhecidos pelos médicos. A prescrição de tratamento, por exemplo, decisões sobre dosagem etc, está

dentro da responsabilidade dos clínicos gerais e outros doutores médicos e pode depender da severidade dos sintomas e/ou progressão de uma doença a ser tratada. As doses apropriadas de anticorpo são bem conhecidas na técnica (Ledermann 1991 e Bagshawe 1991. As dosagens específicas aqui indicadas ou no Physician's Desk Reference (2003) como apropriadas para o tipo de medicamento que é administrado, podem ser usadas. Uma quantidade terapeuticamente eficaz ou dose adequada de um membro de ligação da invenção podem ser determinadas comparando-se a sua atividade *in vitro* e atividade *in vivo* em um modelo de animal. Os métodos para a extrapolação de dosagens eficazes em camundongos e outro animais de teste aos seres humanos são conhecidos. A dose precisa dependerá de vários fatores, incluindo se o anticorpo é para diagnóstico, prevenção ou para tratamento, do tamanho e localização da área a ser tratada, da natureza exata do anticorpo (por exemplo, anticorpo integral, fragmento ou diacorpo) e da natureza de qualquer rótulo detectável ou outra molécula ligada ao anticorpo. Uma dose de anticorpo típica estará na faixa de 100 μg a 1 g para aplicações sistêmicas, e de 1 μg a 1 mg para aplicações tópicas. Uma dose de carga inicial mais alta, seguida por uma ou mais doses mais baixas, pode ser administrada. Tipicamente, o anticorpo será um anticorpo integral, por exemplo, o isótipo IgG1. Isto é uma dose para um tratamento único de um paciente adulto, que pode ser proporcionalmente ajustado para crianças e bebês e também ajustadas para outros formatos de anticorpo em proporção ao peso molecular. Os tratamentos podem ser repetidos em intervalos diariamente, duas vezes por semana, semanal ou mensalmente, no critério do médico. Os tratamentos podem ser a cada duas a quatro semanas para a administração subcutânea e a cada quatro a oito semanas para a administração intravenosa. Em algumas formas de realização da presente invenção, o tratamento é periódico e o período entre as administrações é de cerca de duas semanas ou mais, por exemplo, de cerca de três semanas ou mais, de cerca de quatro semanas ou

mais ou de cerca de uma vez ao mês. Em outras formas de realização da invenção, o tratamento pode ser dado antes e/ou depois da cirurgia e pode ser administrado ou aplicado diretamente no local anatômico de tratamento cirúrgico.

Exemplos

Exemplo 1: Isolação de Anticorpo Condutor

1.1 Seleções

Bibliotecas de anticorpo humano de Fv de cadeia única (scFv) grande clonadas em um vetor de fagomídeo com base no fago filamentoso M13 foram usados para as seleções (Vaughan *et al* 1996, Hutchings *et al* 2001). Os anticorpos scFv específicos anti-IL-17A foram isolados das bibliotecas de demonstração de fago usando uma série de ciclos de seleção na IL-17A humana recombinante essencialmente como anteriormente descrito (Vaughan *et al* 1996). Em resumo a IL-17A humana em PBS (PBS de Dulbecco, pH 7,4) foi absorvida em reservatórios de uma placa de microtítulo durante a noite a 4°C. Os reservatórios foram lavados com PBS depois bloqueados por 1 h com PBS-Marvel (3% p/v). O fago purificado em PBS-Marvel (3% p/v) foram adicionados aos reservatórios e deixados ligar o antígeno revestido por 1 hora. O fago não ligado foi removido por uma série de ciclos de lavagem usando PBS-Tween (0,1% v/v) e PBS. As partículas de fago ligadas foram eluídas, infectadas em bactérias e recuperadas para a rodada seguinte de seleção (Vaughan *et al* 1996).

Um número representativo de clones individuais da segunda rodada de seleções foi cultivado em placas de 96 reservatórios. ScFvs foram expressados no periplasmo bacteriano e triados quanto a sua atividade inibidora em um ensaio de ligação de receptor de IL-17A. ScFv que mostrou um efeito inibidor significante da interação de IL-17A:IL-17RA como extratos periplásmicos brutos, foram submetidos ao seqüenciamento de DNA (Vaughan 1996, Osbourn 1996). As scFvs únicas foram expressadas mais uma vez em bactérias e purificadas pela cromatografia de afinidade (Bannister

et al 2006) e valores IC_{50} foram determinadas testando-se as séries de diluição de scFvs purificadas no ensaio de ligação de receptor-ligando HTRF® e nos ensaios HT1080 de liberação de IL-6 contra IL-17 humana e de cinomolgo.

1.2 Seletividade e reatividade cruzada de espécies de anticorpos em ensaios de competição de epítopo DELFIA®

A reatividade cruzada e seletividade de espécie de anticorpos ao membros da família IL-17 foram estabelecidos usando ensaios de competição de epítopo DELFIA®, medindo-se a inibição da ligação de HIS FLAG IL-17A (doméstico, derivado de HEK EBNA), de cada anticorpo anti-IL-17 imobilizado.

As titulações de IL-17A humana não rotulada purificada (doméstica derivada de *E. coli*), IL-17B (Peprotech), IL-17C (R & D Systems), IL-17D (Peprotech), IL-17E (R & D Systems) e IL-17F (Peprotech) foram testadas em cada ensaio para estabelecer a potência para cada membro da família IL-17, como mediado pelas valores IC_{50} no ensaio.

As titulações da espécie de IL-17 incluindo humana, de cinomolgo (doméstica derivada de *E. coli*) e IL-17A de murino (R & D Systems) foram testadas em cada ensaio para estabelecer a reatividade cruzada da espécie dos anticorpos.

A IgG purificada foi absorvida em placas microtituladoras de 96 reservatórios Maxisorp (Nunc) em solução salina tamponada com fosfato (PBS), a uma concentração que deu um sinal significante quando IL-17A humana biotinilada foi adicionada aproximadamente no seu Kd estimado para aquela IgG particular. A IgG em excesso foi retirada por lavagem com PBS-Tween (0,1% v/v) e os reservatórios foram bloqueados com PBS-Marvel (3% p/v) por 1 hora. Uma série de diluição de competidor (IL-17A ou membros da família de IL-17 de murino ou cinomolgo) foi preparada em PBS, partindo de uma concentração de aproximadamente 200 vezes o valor do Kd da interação entre IL-17A humana biotinilada e a respectiva IgG. IL-17A humana não

biotinilada foi usada como um controle positivo. A esta série, um volume igual de IL-17A humana recombinante biotinilada a uma concentração de aproximadamente 2 vezes o Kd foi adicionado (resultando em uma série partindo a uma razão de antígeno competidor:IL-17A humana biotinilada de aproximadamente 100:1). Estas misturas foram depois transferidas na IgG bloqueada e deixada equilibrar por 1 hora. O antígeno não ligado foi removido lavando-se com PBS-Tween (0,1% v/v), enquanto que a IL-17A humana biotinilada remanescente foi detectada pelo conjugado de estreptavidina-Európio3+ (detecção DELFIA®, PerkinElmer). A fluorescência resolvida com o tempo foi medida a 620 nm em uma leitora de placa EnVision (PerkinElmer). Os dados de fluorescência foram convertidos a% de ligação específica (100% foram determinados a partir dos reservatórios de controle contendo IL-17A humana biotinilada mas nenhum competidor, 0% foi a partir dos reservatórios contendo IL-17A humana biotinilada e um excesso de 100 vezes de IL-17A humana não biotinilada). Os dados resultantes foram analisados usando o software de ajuste de curva Prism (Graphpad) para determinar valores IC_{50}. Devido às afinidades diferentes de cada IgG à IL-17A e portanto às condições de ensaio diferentes usadas, os resultados foram expressados como diferença de vezes em valores IC_{50} entre IL-17A humana e antígenos competidores. Isto possibilita a comparação de IgG diferentes.

Tabela 1: Potência de membros da família da IL-17 e espécies de IL-17 diferentes em ensaios de IgG que liga IL-17A humana (DELFIA®)

	IC50 (nM)					
Nome do Clone	**IL-17A Humana**	**IL-17A de Murino**	**Diferença em vezes de IL-17A Humana**	**IL-17A Cino**	**Diferença de vezes de IL-17A Humana**	**IL-17 B a F Humana**
TINA1	12	98	12	NI	-	NI
TINA2	28	NI	-	4	0,14	ND
TINA10	7	50%	-	21	3	NI
TINA11	4	NI	-	28	7	NI
Anticorpo 1	6	NI	-	69	11,5	NI
TINA21	6	NI	-	20	3,1	NI
TINA22	7	NI	-	7	1	ND
TINA48	9	NI	-	7	0,8	NI
TINA51	25	35	0,7	NI	-	NI

ND indica não determinado, NI nenhuma inibição. Nenhuma inibição da ligação de IL-17A humana foi observada com IL-17B a F para qualquer um dos clones testados.

1.3 Inibição da ligação de IL-17A ao receptor de IL-17

Os produtos de seleção foram triados no formato de ensaio HTRF® de ligação de receptor-ligando (Fluorescência Resolvida com o Tempo Homogênea, CIS Bio international) para a inibição de, IL-17A humana biotinilada (Peprotech 200-17) ou IL-17A humana identificada com HIS FLAG (doméstica derivada de HEK EBNA) que liga a proteína de fusão IL-17RA Fc (R & D Systems 177-IR). Um mAb anti-IL-17 de referência (Biosource) foi incluído em todos os ensaios de potência como um controle positivo. O método de ensaio detalhado é fornecido na seção de Materiais e Métodos de Ensaio.

Os exemplos das potências scFv condutoras obtidas do ensaio da proteína de fusão de IL-17RA Fc que liga a IL-17A humana identificada com HIS FLAG são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Exemplos de potências scFv condutoras no ensaio de IL-17RA Fc que liga HIS FLAG IL-17A

Nome do Clone	IC_{50} (nM) no ensaio de HTRF®	Nome do Clone	IC_{50} (nM) no ensaio de HTRF®
TINA1	213	TINA22	53
TINA2	118	TINA48	57
TINA10	59	TINA51	80
TINA11	156	TINA55	79
Anticorpo 1	12	TINA62	4
TINA21	36	TINA107	25

1.4 Ligação de Epítopo.

scFv condutoras foram testadas no ensaio de competição de epítopos quanto a inibição de anticorpos IL-17 anti-humanos que ligam HIS FLAG IL-17A humana (doméstica derivada de HEK EBNA) incluindo Anticorpo 1 precursor, mAb317 (R & D Systems) ou o mAb da Biosource.

O ensaio de competição de epítopos usando mAb317 ou o mAb da Biosource envolveu pré-incubar 3 nM ou 6 nM de anticorpo anti-IL-

17 com 20 nM ou 10 nM de Fc anti-murino rotulado com XL665 (CIS Bio International 61PAMXLB) em 50 mM de tampão de HEPES contendo 0,4 M de fluoreto de potássio e 0,1% de BSA (tampão de ensaio) respectivamente. Anticorpo e detecção XL665 foram pré-incubados por 1 hora no escuro na temperatura ambiente. Para o ensaio usando Anticorpo 1, o Anticorpo 1 foi diretamente rotulado com criptato (CIS Bio International 62EUSPEA) e diluído 500 vezes em tampão de ensaio antes do uso.

Em paralelo, para ensaios usando mAb317 ou mAb Biosource, 10 nM de IL-17A biotiniladas (20 nM monomérico) foi pré incubado por 1 hora na temperatura ambiente no escuro com 3,2 nM de criptato de estreptavidina em tampão de ensaio. Para o ensaio do anticorpo 1, 2 nM de HIS FLAG IL-17A (4 nM monomérico) foi pré incubado por 1 hora na temperatura ambiente no escuro com 2 nM de anticorpo anti-Flag rotulado com XL665 (CIS Bio International 61FG2XLB) em tampão de ensaio.

Depois da pré-incubação dos reagentes, 10 µl de amostra de scFv purificada foram adicionados a uma placa de ensaio de volume baixo de 384 reservatórios (Costar). Isto foi seguido pela adição de 5 µl do anticorpo de IL-17 pré incubado e sua detecção XL665 para ensaios usando mAb317 ou o mAb da Biosource e depois 5 µl da IL-17A biotinilada humana e mistura de detecção de criptato.

Para o ensaio do anticorpo 1, 10 µl de amostra de scFv purificada foram adicionados a uma placa de ensaio de volume baixo de 384 reservatórios, seguidos pela adição de 5 µl do Anticorpo 1 rotulado com criptato e depois 5 µl da mistura de HIS FLAG IL-17A e mistura de detecção XL665.

As placas de ensaio foram depois centrifugadas a 1000 rpm na temperatura ambiente por 1 min e incubadas por até 4 horas na temperatura ambiente, antes de ler a fluorescência Resolvida pelo Tempo a 620 nm e 665 nm de comprimentos de onda de emissão usando uma leitora de placa

EnVision (Perkin Elmer).

Os dados foram analisados calculando-se os valores de% Delta F (CIS Bio International) para cada amostra, que foram depois usadas para determinar a% de ligação específica.

Os resultados estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados de exemplo da caracterização de scFv condutoras nos ensaios de competição de epítopo de IL-17A

Nome do clone	Inibição no ensaio de competição de epítopo contra:		
	Anticorpo 1	mAb 317	mAb da Biosource
TINA1	+++	+	+++
TINA7	+	+	+
TINA10	+++	+	+++
TINA11	+++	+	+++
TINAl2	+++	+	+++
TINA21	+++	++	+++
TINA22	+++	+++	++
TINA48	+++	+	+++
TINA51	++	+	++
TINA55	+/-	+	+++
TINA62	+/-	+	++
TINA107	+++	+	+++
Anticorpo 1 (TINA12 IgG1)	+++	-	+++
mAb 317 (R & D systems)	+/-	+++	+/-
mAb da Biosource	+++	+/-	+++

+++ boa inibição observada.
+ inibição deficiente observada.
- nenhuma inibição observada

Graus diferentes de inibição foram observados entre o painel condutor de scFv nos 3 ensaios de competição de epítopo, indicando que alguns destes clones reconheceram levemente epítopos diferente ou de sobreposição de outros scFv no painel e dos mAbs com os quais os ensaios foram estabelecidos.

1.5 Reforma de scFv a IgG1

Os clones foram convertidos do formato de scFv para IgG sub-clonando-se os domínios VH e VL em vetores que expressam cadeias pesadas e leves de anticorpo inteiras respectivamente. O domínio VH foi clonado em um vetor (pEU15.1) contendo os domínios constantes da cadeia pesada

humana e elementos regulatórios para expressar a cadeia pesada de IgG inteira em células de mamífero. Similarmente, o domínio VL foi clonado em um vetor (pEU4.4) para a expressão dos domínios constantes da cadeia leve (lambda) humana e elementos regulatórios para expressar a cadeia leve de IgG inteira em células de mamífero. Os vetores para a expressão de cadeias pesadas e cadeias leves foram originalmente descritos em Persic *et al*, 1997. Os vetores da Cambridge Antibody Technology foram engendrados simplesmente pela introdução de um elemento OriP. Para se obter IgGs, os vetores que expressam IgG de cadeia pesada e leve foram transfectados em células de mamífero EBNA-HEK293. As IgGs foram expressadas e secretadas no meio. As colheitas foram reunidas e filtradas antes da purificação. A IgG foi purificada usando a cromatografia de Proteína A. Os sobrenadantes de cultura são carregados em uma coluna de tamanho apropriado de Proteína A Cerâmica (BioSepra) e lavados com 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 250 mM de NaCl. A IgG ligada foi eluída da coluna usando 0,1 M de Citrato de Sódio (pH 3,0) e neutralizada pela adição de Tris-HC1 (pH 9,0). O material eluído foi trocado de tampão em PBS usando colunas Nap10 (Amersham, #17-0854-02) e a concentração de IgG foi determinada espectrofotometricamente usando um coeficiente de extinção com base na seqüência de aminoácido da IgG Mach *et al* 1992. A IgG purificada foi analisada quanto a agregação ou degradação usando SEC-HPLC e pela SDS-PAGE.

1.6 Liberação induzida por IL-17 de IL-6 a partir das células HT1080

Para determinar a bioatividade de inibidores de IL-17, a atividade de scFv e IgG foi avaliada em um ensaio de célula de fibrossarcoma humano HT1080. Estas células respondem à IL-17 humana pela liberação de IL-6 em uma maneira dependente da dose. Para detalhes do método de ensaio, ver a seção "Materiais e Métodos de Ensaio".

Neste ensaio, a atividade inibidora, como determinada pelos

seus valores IC_{50}, de um painel de scFv/IgG anti-IL-17 foi determinada em resposta a 1 nM de IL-17A humana ou 1 nM de IL-17A de primata não humano cinomolgo (cino). As potências de scFv e IgG obtidas são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4: Exemplos de potências scFv e IgG no ensaio de HT1080

	IL-17 Humana			IL-17 de Cino	
Nome do clone	**Inibição de scFv**	**IC_{50} de IgG (nM)**		**IC_{50} de IgG (nM)**	
TINA1	**IA**	**50% de Inibição**		**IA**	
TINA10	inibição	54 ±26	(n = 3)	155 ± 26	(n=3)
TINA11	inibição	92 ±16	(n = 2)	216 ± 188	(n = 2)
Anticorpo 1	inibição	22 ±10	(n = 6)	172 ± 32	(n = 5)
TINA21	inibição	29 ±11	(n = 6)	28 ± 15	(n = 5)
TINA48	inibição	69 ±15	(n = 3)	33 ± 4	(n = 3)
TINA51	inibição	17	(n = 1)	IA	

NT Não testado
IA Inativo

scFv da isolação condutora no geral deu inibição fraca no ensaio de HT1080, tal que as potências não puderam ser determinadas. Portanto, qualquer inibição que exibe scFv no ensaio de HT1080 foi reformada para IgG1 e re-testada no ensaio para determinar a potência mais acuradamente e para permitir que os clones fossem classificados.

Exemplo 2: Otimização de Anticorpo

2.1 Maturação de Afinidade

Os anticorpos condutores foram otimizados usando um método da mutagênese alvejada e seleções de demonstração de fago com base na afinidade. As bibliotecas de scFv-fago grandes derivadas dos clones condutores foram criados pela mutagênese direcionada a oligonucleotídeo das regiões determinadoras de complementaridade 3 (CDR3) das cadeias pesada (VH) e leve (VL) variáveis usando técnicas da biologia molecular padrão como descrito (Clackson 2004). As bibliotecas foram submetidas às seleções de demonstração de fago com base na afinidade de modo a selecionar variantes com afinidade mais alta para IL-17A. Em conseqüência, isto mostraria uma atividade inibidora melhorada para a ligação de IL-17A ao seu receptor. As seleções foram realizadas essencialmente como anteriormente

descritas (Thompson 1996). Em resumo, as partículas de scFv-fago foram incubadas com IL-17A humana biotinilada recombinante em solução (bio-huIL-17A, doméstica HEK EBNA derivada e modificada doméstica). ScFv-fago ligados ao antígeno foram depois capturados em pérolas paramagnéticas revestidas com estreptavidina (Dynabeads® M-280) seguindo as recomendações do fabricante. As partículas de scFv-fago selecionadas foram depois recuperadas como anteriormente descrito (Osbourn 1996) e o processo de seleção foi repetido na presença de concentrações decrescentes de bio-huIL-17A (100 nM a 10 pM em 5 rodadas). Extratos periplásmicos contendo scFv brutos foram preparados a partir de um número representativo de clones individuais a partir dos produtos de seleção e triados quanto a capacidade para inibir a ligação de biohuIL-17A humana ao receptor de IL-17A humana essencialmente como descrito no Exemplo 1. Os acertos de triagem, i.e. variantes de scFv, que mostraram um efeito inibidor significantemente melhorado quando comparado com os seus respectivos anticorpos precursores, foram submetidos ao seqüenciamento de DNA e variantes únicas foram produzidas como scFv purificado para outra caracterização (ver o Exemplo 1).

Algumas scFv foram depois selecionadas e foram convertidas a IgG1 como descrito no Exemplo 1 e testados mais uma vez. Em um esforço para realizar ganhos de potência adicionais, V_H e V_L melhorada foram recombinadas na etapa de transfecção e a IgG1 resultante foi avaliada. A recombinação de VH e VL ao nível de transfecção é reconhecida como uma técnica um tanto não prognosticável, com sucesso misto na geração de anticorpos de potência melhorada. Entretanto, casualmente, neste caso a técnica teve êxito na produção de várias IgG de potência alta, incluindo anticorpos 3, 4, 5, 7, 9, 10 e 12, como descrito abaixo.

2.2 Linha germinativa

As seqüências de aminoácido dos domínios V_H e V_L dos

anticorpos anti-IL-17A otimizados foram alinhadas às seqüências da linha germinativa humana conhecidas na base de dados VBASE (Tomlinson 1997) e a linha germinativa mais próxima foi identificada pela similaridade de seqüência. Para os domínios VH da linhagem de anticorpo Tina 12 esta foi VH3-23. Para os domínios VL a mesma foi V26a.

Sem considerar os resíduos de Vernier (Foote & Winter 1992), que foram deixados inalterados, houve 1 mudança nas matrizes dos domínios VH e 2 mudanças nos domínios VL, todos os quais foram revertidos para a seqüência da linha germinativa mais próxima para emparelhar identicamente anticorpos humanos usando as técnicas de mutagênese direcionada ao sítio com os iniciadores mutagênicos apropriados. Os resíduos de Vernier no domínio VH foram o Arg do terminal C em VH FR3 (número de resíduo 98 na seqüência do domínio VH), que não foi mudado para Lys na linha germinativa. Os resíduos de Vernier no domínio VL foram Ile em VL FR2 (número de resíduo 47 na seqüência do domínio VL), que não foi revertido para Thr na linha germinativa e Phe em VL FR2 (número de resíduo 50 na seqüência do domínio VL), que não foi revertido para Tyr na linha germinativa.

2.3 Ensaio de receptor-ligando HTRF® de clones otimizados

Os produtos de seleção otimizados foram triados em um ensaio de ligação de receptor-ligando HTRF® para a inibição da proteína de fusão de IL-17RA Fc que liga a IL-17A humana identificada em HIS FLAG (doméstica derivada de HEK EBNA), como descrito na seção materiais e métodos de ensaio.

As potências de scFv purificada identificada como acertos a partir da triagem foram depois determinadas no ensaio de ligação de receptor-ligando HTRF®. Os exemplos das potências de scFv condutora obtidos são mostrados na Tabela 5. Os dados aqui mostrados são para as seqüências de anticorpo que não da linha germinativa.

Tabela 5: Exemplos de potências scFv condutoras otimizadas em ensaio de receptor-ligando HTRF

Nome do clone	IC_{50} (nM) no Ensaio de HTRF®	Nome do clone	IC_{50} (nM) no Ensaio de HTRF®
Anticorpo 1	12,0	Anticorpo 13	1,6
Anticorpo 2	0,7	Anticorpo 14	2,5
Anticorpo 3	ND	Anticorpo 15	1,6
Anticorpo 4	ND	Anticorpo 16	1,6
Anticorpo 5	ND	FORD022E03	8
Anticorpo 6	1,7	FORD023A05	6
Anticorpo 7	ND	FORD025D03	7
Anticorpo 8	0,7	FORD022B08	6
Anticorpo 9	ND	FORD023B10	4
Anticorpo 10	ND	FORD146B02	13
Anticorpo 11	0,6	FORD016D04	0,6
Anticorpo 12	ND	Biosource mAb	1,5

*ND = não determinado, visto que scFv destes clones não disponível. Estes clones foram criados pela recombinação no estágio IgG.

2.4 Ensaio de liberação de IL-6 em HT1080 de clones otimizados

A melhoras na bioatividade a seguir da otimização dos anticorpos da isolação de condutor foram avaliadas na célula de fibrossarcoma humano HT1080 como descrito na seção "Materiais e Métodos de Ensaio". Todos os ensaios foram realizados usando IL-17A humana derivada do sistema de expressão HEK-EBNA e IL-17A de cinomolgo do sistema de expressão derivado de *E. coli* ou o HEK EBNA.

Um painel de scFv/IgG anti-IL-17 otimizado foi avaliado no ensaio de HT1080 em resposta a 1 nM de IL-17A humana ou 1 nM de cinomolgo (cino) em uma maneira dependente da concentração. As potências de scFv e IgG de exemplo obtidas são mostradas na Tabela 6A.

Tabela 6A: Exemplos de potências de scFv e IgG melhoradas no ensaio de HT1080.

	IL-17 Humana		IL-17 de Cino		Diferença de vezes na reatividade cruzada (IgG)
Nome do clone	IC_{50} de scFv (nM)	IC_{50} de IgG (nM)	IC_{50} de scFv (nM)	IC_{50} de IgG (nM)	
Anticorpo 1	70% de Inibição	23,0	IA	144,0	6
Anticorpo 2	16,2	1,5	99,0	18,3	12
Anticorpo 3	-	0,8	-	13,0	16
Anticorpo 4	-	0,9	-	7,3	8
Anticorpo 5	-	1,4	-	39,7	28
Anticorpo 6	31,2	1,5	135,8	39,6	26
Anticorpo 7	-	0,7*	-	5,01†	7
Anticorpo 8	34,3	2,9	96,4	53,0	18
Anticorpo 9	-	2,3	-	9,2	4
Anticorpo 10	-	2,2	-	4,9	2
Anticorpo 11	8,2	2,2	20% Inibição	25,0	4
Anticorpo 12	-	2,1	-	4,2	2
Anticorpo 13	35,9	2,0	147,0	28,8	14
Anticorpo 14	36,7	1,8	99,5	29,0	16
Anticorpo 15	21,7	1,7	158,8	30,9	19
Anticorpo 16	13,0	1,6	249,0	29,5	19
FORD023B10	24,7	3,4	14,1	1,5	2
FORD023A05	30,6	3,3	17,0	8,7	3
FORD025D03	34,1	2,5	26,3	6,6	3
FORD022B08	39,6	4,5	22,1	4,6	1
FORD022E03	47,7	14,6	31,2	17,0	1
FORD146B02	52,1	9,3	30,7	17,5	2
mAb 317 (R & D systems)	-	3,2	-	14,1	4
mAb Biosource	-	6,2	-	6,8	1

* Outros experimentos (dataset n = 15) indicaram um valor de IC50 médio geométrico de 0,8, intervalos de confidência a 95% de 0,6 a 1,0

† Outros experimentos (dataset n = 12) indicaram um valor IC50 médio geométrico de 4,8, intervalos de confidência a 95% de 3,2 a 6,4.

2.5 Ensaio de célula HT1080 que mede a liberação sinergizada de IL-6

As células HT1080 podem responder à IL-17A humana e TNFα humano liberando-se sinergisticamente IL-6 em uma maneira dependente da concentração. A bioatividade de Anticorpos 2 e 7 otimizados para a resposta de IL-6 sinergizada foi avaliada usando uma modificação para o método de ensaio de célula HT1080 anteriormente descrito, em que a liberação de IL-6 foi medida em resposta a 125 pM de IL-17 humana e 25 pM de TNFα humano (ver a seção "Materiais e Métodos de Ensaio").

Tanto o Anticorpo 2 quanto o 7 neutralizaram a resposta de IL-6 sinergizada. Os valores de IC_{50} de exemplo são mostrados na Tabela 6b.

Tabela 6b: Exemplos de potências de IgG1 no ensaio em HT1080 de IL-17/TNFα

Nome do clone	IC50 de IgG (nM)
Anticorpo 7	0,24 (95% de CI 0,19-0,28)
Anticorpo 2	0,41

2.6 Inibição de respostas nativas induzidas pela IL-17A em células HT1080

A capacidade dos anticorpos para inibir uma fonte nativa de IL-17A foi avaliada usando IL-17A derivada de células T humanas primárias. A IL-17A recombinante derivada da *E. coli* não é glicosilada diferente de uma fonte nativa que tem um sítio de glicosilação ligado em N. A avaliação dos anticorpos usando IL-17A derivada de célula T garantirá a atividade mantida contra uma fonte natural de proteína.

As células T de doadores humanos saudáveis foram estimuladas usando condições para realçar a produção de IL-17A. Estes sobrenadantes conterão outras citocinas tais como TNFα que podem sinergizar com qualquer IL-17A presente. Os meios condicionados das células T foram adicionados às células HT1080 na presença ou ausência de anticorpo e a indução de IL-6 acima da linha de base foi avaliada. A partir disto, os valores de IC_{50} foram calculados. Um método detalhado para este ensaio é fornecido na seção Materiais e Métodos de Ensaio.

Tabela 6c: Efeitos de anticorpos sobre a produção de IL-6 induzida pelo sobrenadante de célula T em células HT1080 (os valores de IC_{50} calculados em nM, com intervalos de confidência a 95%)

	IC_{50} (nM)	
Anticorpo (IgG1)	Média (95% de CI)	n
Anticorpo 2	0,25 (0,09 - 0,74)	3
Anticorpo 7	0,13 (0,04 - 0,46)	3

2.7 Seletividade e reatividade cruzada de espécie de anticorpos otimizados em ensaio de competição de epítopo HTRF®

A seletividade e reatividade cruzada de espécie de anticorpos condutores aos membros da família da IL-17 foram estabelecidas usando ensaios de competição de epítopo HTRF®, pelo qual mede-se a inibição da

ligação de HIS FLAG IL-17A (derivada de HEN EBNA doméstica) por cada anticorpo anti-IL-17 otimizado.

As titulações de IL-17A humana purificada não rotulada (derivada de *E. coli* doméstica), IL-17B (Peprotech), IL-17C (R&D Systems), IL-17D (Peprotech), IL-17E (R&D Systems) e IL-17F (Peprotech) foram testadas em cada ensaio para estabelecer a potência para cada membro da família de IL-17, como medido pelos valores IC_{50} no ensaio.

As titulações da espécie de IL-17 incluindo a humana, de cinomolgo, cão (todas derivadas de *E. Coli* doméstica) e IL-17A de murino (R & D Systems) foram testadas em cada ensaio para estabelecer a reatividade cruzada da espécie dos anticorpos otimizados.

Os resultados estão resumidos na Tabela 7. Os dados iniciais indicaram que os anticorpos otimizados condutores testados foram seletivos para a IL-17A humana e não reconheceram os membros da família IL-17B, C, D, E e F.

Em outros experimentos, a inibição parcial foi observada com IL-17F humana, quando usada a uma concentração de 1 μM ou maior, com o Anticorpo 7.

Adicionalmente todos os anticorpos otimizados testados reconheceram IL-17A humana, de cinomolgo e cão com graus variáveis de potência. A IL-17A de murino não foi reconhecida por nenhum dos anticorpos otimizados.

Tabela 7: Potência de membros da família de IL-17 e espécie de IL-17 diferente em ensaio de IgG otimizada que liga IL-17A humana (HTRF®)

Ensaio de Anticorpo Otimizado	IC_{50} nM de espécie/ membro da família IL-17								
	IL-17A Humana	IL-17A de Cino	IL-17A de Murino	IL-17A de Cão	B	C	D	E	F
FORD023A05	1,5	ND	ND	ND	NI	NI	NI	NI	NI
Anticorpo 2	2,9 (1,6*)	4,5	NI	34	NI	NI	NI	NI	NI
Anticorpo 7	1,4 (0,9*)	2,0 (1,7*)	NI	14 (11,9*)	NI	NI	NI	NI	Inibição parcial observada (20% de inibição a aprox 1 μM ou mais)
mAb da Biosource	3,7	4,0	NI	50 nM	NI	NI	NI	NI	NI

B = IL-17B humana
C = IL-17C humana
D = IL-17D humana
E = IL-17E humana
F = IL-17F humana
NI = nenhuma inibição
ND = não determinado
* Valores em colchetes representam valores IC_{50} médios subseqüentemente calculados obtidos de 2 ou mais experimentos separados.

Exemplo 3: Afinidade de anticorpos para IL-17A humana

3.1 Análise pA_2

De modo a caracterizar ainda mais os anticorpos anti-IL-17A a análise pA2 foi realizada nos anticorpos, usando o método descrito na seção Materiais e Métodos de Ensaio. Isto foi usado para estimar a constante de dissociação de equilíbrio (Kd) para a IgG contra a IL-17A humana. A análise foi realizada usando as células de fibrossarcoma humana HT1080 e IL-17A humana expressada em HEK EBNA.

A análise estimou as afinidades de IgG anti-IL-17 como sendo entre 65 pM e 550 pM para a IL-17A humana, com os dados de exemplo mostrados na Tabela 8. A análise também foi realizada com o mAb da Biosource e um mAb de controle negativo. A afinidade dos anticorpos isolados foi mostrada estar entre 2 e 5 vezes maior do que o mAb Biosource.

Tabela 8a: Afinidades de Exemplo de IgG para IL-17A humana

	Valor pA_2	**Kd (pM)**
Anticorpo 2	9,73	188
Anticorpo 7	9,23	553
mAb Biosource	8,96	1100

3.2 Dados de afinidade de ligação usando análise de biossensor

O BIAcore 2000 (GE Healthcare) foi usado para avaliar os parâmetros cinéticos da interação entre Anticorpo 7 e espécie diferente de IL-17A.

O Biossensor usa os efeitos ópticos de ressonância de plasma de superfície (SPR) para estudar as mudanças na concentração da superfície que resulta da interação de uma molécula de analito que é lavada sobre uma molécula de ligando covalentemente ligada à camada de dextrano de um chip

biossensor. Tipicamente, uma concentração definida da espécie de analito é lavada sobre o ligando ligado e qualquer ligação é detectada como um aumento no sinal SPR local (fase de associação). Isto é seguido por um período de fluxo de tampão, durante o qual a dissociação da espécie de analito pôde ser observada como uma diminuição no sinal (fase de dissociação). O analito remanescente pode ser depois despojado do ligando ligado ao chip e o procedimento repetido em diversas concentrações de analito diferentes. Uma série de controles é usualmente utilizada durante um experimento para garantir que nem a capacidade de ligação absoluta nem o perfil cinético do ligando ligado muda significantemente durante o experimento inteiro. Uma Solução Salina Tamponada com Hepes Patenteada (HBS-EP) é tipicamente usada como o tampão de diluição principal para as amostras de analito e como o tampão de fluxo durante a fase de dissociação. Os dados experimentais são registrados como Unidades de Ressonância arbitrárias (RUs, que são unidades arbitrárias que diretamente correspondem ao sinal de SPR) versus o tempo (segundos). As RUs são diretamente proporcionais às mudanças no índice refrativo na superfície do chip que por sua vez é uma medida aproximada da massa de analito ligada. O pacote de software BIAevaluation pode ser depois usado para processar os dados e ajustar os modelos de ligação para os conjuntos de dados. As constantes de taxa de associação (M^{-1} s^{-1}) e dissociação (s^{-1}) retornadas permitem o cálculo das constantes de Afinidade de Associação (M^{-1}) e Dissociação (M).

A afinidade do anticorpo 7 foi estimada usando um ensaio único em que a IgG_1 foi covalentemente (ligada pela amina) ligada a uma superfície do chip CM3 patenteado a uma densidade de superfície de 300 RU final. Uma série de diluições de IL-17A humana recombinante ou de cinomolgo (0,78 a 50 nM) foram depois seqüencialmente passados sobre o anticorpo 7. A molaridade do ligando foi fundamentada em coeficientes de absorbância e extinção a 280 nm calculados usando métodos publicados. Os

dados da célula de fluxo em branco foram subtraídos da IgG_1 e um branco do tampão HBS-EP foi subtraído conjunto de dados principal ("subtração de branco duplo"). O modelo Langmuir 1:1 e modelos de Analito Bivalente foram depois ajustados para os dados de cada conjunto de concentração de analito simultaneamente usando o software BIAevaluation 3.2.

A validade dos dados foi avaliada/restrita pelos valores Chi^2 e T calculados (parâmetro valor/compensação), que foi <2 e > 100 respectivamente.

O Anticorpo 7 foi imobilizado na superfície de um chip CM3 e uma série de diluições de variantes IL-17 recombinantes (0,78 a 50 nM) foram seqüencialmente passados sobre a IgG_1. Os dados foram ajustados simultaneamente para o modelo Langmuir 1:1 (k_a k_d simultâneo) e simultaneamente para o modelo de Analito Bivalente (ka kd simultâneo). O modelo de Analito Bivalente deu melhores ajustes como julgado pelo olho e pelos seus valores Chi^2 superiores. Uma constante de afinidade (Kd) foi depois calculada a partir da razão de constantes de taxa kd1/ka1.

Tabela 8b: A análise cinética de Anticorpo 7

Antígeno	**1:1 Langmuir K_D (nM)**	**Analito Bivalente K_D (nM)**
IL-17A humana (*E. coli*)	0,195	2,098
IL-17A de Cino (*E. coli*)	0,512	1,340
IL-17A humana-Flag-His10 (HEK)	0,171	0,41 a 1,88

Exemplo 4: Inibição de atividade induzida pela IL-17A em condrócitos primários humanos

A destruição da cartilagem articular é uma característica de muitas doenças inflamatórias incluindo artrite reumatóide e osteoartrite.

O tipo de célula principal dentro da cartilagem articular da junta é o condrócito. Os condrócitos humanos primários podem ser isolados a partir de tecido removido durante a cirurgia de substituição dos joelhos. As células são extraídas da cartilagem pela digestão com colagenase e cultivadas sob condições assépticas para o uso em ensaios *in vitro*. Os condrócitos

quando estimulados com IL-17 recombinante ou nativa produzem uma faixa de mediadores inflamatórios e destrutivos incluindo citocinas (tais como IL-6, IL-8), PGE2 e enzimas degradativas tais como MMP13. O ensaio é descrito em detalhes na seção Materiais e Métodos de Ensaio aqui.

As Tabelas 9a e 10a mostram os dados preliminares para anticorpos IgG1 usados neste ensaio. As Tabelas 9b e 10b mostram dados atualizados calculados para um conjunto de dados maior (números n aumentados).

Tabela 9a: Dados preliminares sobre a Inibição da liberação de IL-6 Induzidas por IL-17A a partir de condrócitos humanos primários pelos anticorpos anti-IL-17A

IgG1	0,2 nM de IL-17A	n	2 nM de IL-17A	n
FORD023A05	2,77 (1,05 - 7,31)	4	5,75 (2,69 - 12,30)	4
Anticorpo 2 (não-GL*)	0,85 (0,44 - 1,65)	4	5,76 (3,39 - 9,90)	4
mAb da Biosource	1,02 (0,78 - 1,32)	9	5,18 (4,02 - 6,67)	12
TINA10	27,23 (10,02 - 74,00)	5	87,97 (52,92 - 146,24)	7
Anticorpo 1	29,85 (11,23 - 79,29)	4	75,67 (27,55 - 207,82)	4

IC_{50} média geométrica mostrada em nM (limites de confidência a 95%).
* O Anticorpo 2 foi usado na forma que não da linha germinativa neste ensaio.

Tabela 9b: Dados atualizados sobre a Inibição da liberação de IL-6 induzida por IL-17A de condrócitos primários humanos pelos anticorpos anti-IL-17^A

IgG1	0,2 nM de IL-17A	n	2 nM de IL-17A	n
Anticorpo 2	1,52 (0,61 - 3,78)	5	5,51 (3,54 - 8,57)	5
mAb Biosource	1,03 (0,80 - 1,33)	12	5,70 (4,64 - 7,01)	12
Anticorpo 7	0,51 (0,18 - 1,43)	6	1,44 (0,79 - 2,64)	6

IC_{50} média geométrica mostrada em nM (limites de confidência a 95%).

Tabela 10a: Dados preliminares sobre a Inibição da liberação de IL-8 induzida por IL-17A a partir de condrócitos primários humanos pelos anticorpos anti-IL-17A

IgG1	0,2 nM de IL-17A	n	2 nM de IL-17A	n
FORD023A05	2,77 (1,86 - 4,11)	7	7,84 (4,12 - 14,90)	7
Anticorpo 2 (não GL*)	0,74 (0,46 - 1,18)	7	3,81 (2,24 - 6,45)	7
Anticorpo 2	2,30	3	7,91	3
Anticorpo 7	0,17	3	1,60	3
mAb Biosource	0,78 (0,52 - 1,17)	10	3,98 (3,09 - 5,12)	14
TINA10	21,42 (12,85 - 35,69)	7	61,96 (45,76 - 83,90)	9
Anticorpo 1	18,12 (10,7 - 30,67)	4	44,47 (39,93 - 49,53)	4

IC_{50} média geométrica mostrada em nM (limites de confidência a 95%).
* O Anticorpo 2 foi testado nas formas da linha germinativa e da linha não germinativa

neste ensaio.

Tabela 10b: Dados preliminares sobre a Inibição da liberação de IL-8 induzida por IL-17A a partir de condrócitos primários humanos pelos anticorpos anti-IL-17A

IgG1	0,2 nM de IL-17A	n	2 nM de IL-17A	n
Anticorpo 2	1,49 (0,80 - 2,78)	8	7,18 (4,38 - 11,75)	8
Anticorpo 7	0,30 (0,14 - 0,63)	8	1,30 (1,10 - 1,54)	9
mAb Biosource	0,85 (0,58 - 1,24)	14	5,09 (4,06 - 6,37)	15

IC_{50} média geométrica mostrada em nM (limites de confidência a 95%).

Tabela 11: Inibição da liberação de MMP13 induzida pela IL-17A a partir de condrócitos primários humanos pelos anticorpos anti-IL-17A

IgG1	0,2 nM de IL-17A	n	2 nM de IL-17A	n
FORD023A05	4,79	2	6,84, > 50	2
Anticorpo 2 (não GL*)	1,55	2	11,53	2
mAb Biosource	1,69 (1,01 - 2,82)	7	11,56 (8,05 - 16,60)	7
TINA10	59,06 (22,49 - 155,07)	6	Faixa: 63,4 - > 400	7
Anticorpo 1	110,04 (35,29 - 343,16)	4	Faixa: 147 - >400	7

IC_{50} média geométrica mostrada em nM (limites de confidência a 95%).
* O Anticorpo 2 foi usado na forma da linha não germinativa neste ensaio.

Tabela 12: Inibição da liberação de PGE_2 Induzida pela IL-17A a partir de condrócitos primários humanos pelos anticorpos anti-IL-17A

IgG1	2 nM de IL-17A	n
FORD023A05	4,75	3
Anticorpo 2 (não GL*)	1,94	3
mAb Biosource	2,83	3
TINA10	NT	
Anticorpo 1	NT	

IC_{50} média geométrica mostrada em nM (limites de confidência a 95%).
NT: Não testado
* O Anticorpo 2 foi usado na forma da linha não germinativa neste ensaio.

Exemplo 5: Inibição da atividade biológica *in vivo* induzida pela IL-17A na bolsa de ar de camundongos Balb C

5.1 Formação da Bolsa de Ar

Camundongos Balb C foram anestesiados com isoflurano e raspados na superfície dorsal. Para formar a bolsa de ar, 2,5 ml de ar estéril filtrado foram injetados subcutaneamente na linha central dorsal com uma agulha de 25g. Os camundongos foram transferidos para as suas gaiolas após a recuperação e no dia 3 os camundongos foram suavemente restringidos e a

bolsa foi re-inflada com 2,5 ml de ar estéril.

Os anticorpos (IgG1) foram avaliados usando dois métodos: pré-misturados, onde anticorpo e IL-17 foram misturados entre si antes da injeção e sistêmico, onde o anticorpo foi administrado antes da injeção de IL-17A. No caso da dosagem sistêmica, o anticorpo foi diluído em PBS estéril e injetado como um bolo, intra-peritonealmente no dia 5.

No dia 6 os camundongos foram mais uma vez suavemente restringidos e cada animal recebeu um volume de injeção intra bolsa de 1 ml de metilcelulose a 0,5% contendo IL-17A humana derivada da *E. Coli* (reagente doméstico) sozinho (no caso do controle ou animais sistemicamente dosados) ou em combinação com anticorpos anti-IL-17 (pré-mistura de anticorpo e IL-17A). Nestes experimentos, o anticorpo e o ligando foram misturados entre si e pré incubados a 37°C por 30 min antes da injeção na bolsa. Os camundongos foram retornados para as suas gaiolas até a amostragem terminal ponto no qual eles foram separados com concentrações crescentes de CO_2. Para ajudar a recuperar do fluido de lavagem da bolsa, 2 ml de PBS contendo 4 mM de EDTA foram suavemente injetados na bolsa e a bolsa foi suavemente apalpada por aproximadamente 15 segundos. O fluido de lavagem foi suavemente retirado da bolsa e decantado em um tubo de polipropileno graduado. O volume recuperado foi registrado. As amostras foram mantidas em gelo até processadas para armazenagem.

5.2 Análise de fluido de lavagem

Contagens de célula sangüínea branca total (TWBC)

Para cada pote Coulter contendo 10 ml de Isoton, 20 µl de fluido de lavagem foram adicionados. As amostras foram lidas em duplicata em um contador Coulter Z1, uma contagem em duplicata foi produzida para cada amostra e a leitura de fundo foi mantida a < 2000. Os números de célula foram depois ajustados levando-se em conta o volume de lavagem recuperado da bolsa.

Quantificação de IL-6

As amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min e 300 µl de sobrenadante foram aliquotados em placas de 96 reservatórios em triplicata e armazenadas a -20°C até prontas para análise. 50 µl de amostras de padrões, controles e fluido de lavagem foram analisados pelo kit de ELISA de citocina IL-6 de Camundongo Quantikine da R & D Systems (Catálogo # M6000B) como pelo protocolo do kit.

As concentrações de IL-6 em fluido de lavagem foram determinadas a partir da curva padrão de IL-6 de camundongo usando a leitora de placa de ELISA SoftMax Pro a 450 nm e comprimento de onda de correção de 540 nm.

5.3 Inibição da liberação de IL-6 induzida por IL-17A na bolsa de ar

Tabela 13a: Inibição da liberação de IL-6 induzida por IL-17A na bolsa de ar de camundongo: anticorpo e IL-17A pré-misturados

	IL-6	
Anticorpo (IgG1)	**% Máxima de Inibição**	**ID_{50} µg**
Anticorpo 2 (não GL*)	46 ± 9	4 ± 3
FORD023A05	51 ± 15	10 ± 11
mAb Biosource	96 ± 8	6 ± 2
Anticorpo 7	115,9	0,5

* O Anticorpo 2 foi usado na linha não germinativa neste ensaio.

Tabela 13b: Inibição da Liberação de IL-6 induzida por IL-17A na bolsa de ar de camundongo: administração sistêmica de anticorpo

	IL-6	
Anticorpo (IgG1)	% Máxima de Inibição	ID_{50} µg (95% de CI)
Anticorpo 7	85,2	0,056 (-0,071 - 0,184)

5.4 Inibição do influxo induzido por IL-17A de células sangüíneas brancas na bolsa de ar

Tabela 14a: Inibição de influxo induzido pela IL-17A de leucócitos na bolsa de ar: anticorpo e IL-17A pré-misturados

	Contagens TWBC	
Anticorpo (IgG1)	**% Máxima de Inibição**	**ID_{50} µg**
Anticorpo 2 (não GL*)	110 ± 23	1 ± 0,4
FORD023A05	91 ± 5	17 ± 12
MAb da Biosource	71 ± 7	3 ± 1,4
Anticorpo 7	111	0,3

* O Anticorpo 2 foi usado na forma da linha não germinativa neste ensaio.

Tabela 14b: Inibição de influxo induzido pela IL-17A de leucócitos na bolsa de ar: administração sistêmica de anticorpo

	TWBC	
Anticorpo (IgG1)	**% Máxima de Inibição**	**ID_{50} µg (95% de CI)**
Anticorpo 7	100,9	0,617 (-0,518 - 1,752)

Exemplo 6: Ensaios de sinergia de IL-17A/TNFα

6.1 Sinergia de IL-17A/TNFα em explantes de cartilagem *post mortem*

A destruição de cartilagem articular é uma característica de muitas doenças inflamatórias incluindo artrite reumatóide e osteoartrite. O tipo de célula principal dentro da cartilagem articular da junta é o condrócito. A cartilagem humana pode ser isolada a partir do tecido removido durante a cirurgia de substituição dos joelhos ou a partir de doadores *post-mortem*. Os discos de explante são cortados da cartilagem e cultivados sob condições assépticas para o uso em ensaios *in vitro*, retendo os condrócitos dentro da sua matriz celular. Os explantes quando estimulados com IL-17A ou TNFα produzem uma faixa de mediadores inflamatórios e destrutivos incluindo citocinas tais como IL-6. Um método detalhado para este ensaio é fornecido na seção Materiais e Métodos de Ensaio.

Em experimentos iniciais para avaliar os efeitos funcionais de anticorpos no ensaio de sinergia de IL-17/TNFα em explantes de cartilagem, os dados de IC_{50} não foram gerados devido ao fornecimento de tecido limitado. A% de inibição vs. a resposta na ausência de membro de ligação (0% de inibição) foi calculada para uma dada concentração de membro de ligação. Os dados são mostrados na Tabela 15a. Em outros experimentos os dados de IC_{50} foram calculados, como mostrado na Tabela 15b.

IL-17A e TNFα em combinação induziram uma resposta de IL-6 sinergizada, que foi inibida pelos anticorpos neutralizantes de IL-17A. Os anticorpos de controle de isótipo não afetaram a resposta sinergizada.

Tabela 15a: Efeitos dos anticorpos sobre as respostas IL-6 sinergizadas por IL-17A e TNFα em explantes de cartilagem *post-mortem* humanos (erro =

desvio padrão de 12 réplicas, n = 1 doador)

	IL-6	(pg/ml)	
Anticorpo (IgG1)	Média	SEM (±)	% de inibição
IL-17A 10 ng/ml	0,38	0,16	-
TNF 1 ng/ml	6,19	3,32	-
IL-17A + TNF	55,00	4,62	0
IL-17A + TNF + mAb Biosource	4,91	1,08	91,1
IL-17A + TNF + controle de isótipo mIgG1	47,41	5,77	13,8
IL-17A + TNF + Anticorpo 2 (não GL*)	4,63	2,30	91,6
IL-17A + TNF + controle de isótipo hIgG1	53,17	8,59	3,3

* O Anticorpo 2 foi usado na forma de linha não germinativa neste ensaio.

Tabela 15b: IC_{50}s de anticorpos em respostas de IL-6 sinergizadas pela IL-17A e TNFα em explantes de cartilagem *post-mortem* humanos (dados médios, intervalos de confidência a 95%)

Anticorpo (IgG1)	**IC_{50} média (95% de CI)**	**n**
Anticorpo 2	3,39	2
Anticorpo 7	- 0,61 (0,26 - 1,42)	5

6.2 Sinergia de IL-17A/TNFα em fibroblastos sinoviais OA

Um traço do dano às juntas em doenças tais como a artrite reumatóide inclui a presença de um sinóvio inflamado composto de células do sistema imune incluindo por exemplo, macrófagos, células T, células B e fibroblastos proliferantes. O sinóvio inflamado pode ser isolado a partir de tecido de junta removido durante a cirurgia de substituição de junta. O sinóvio é colagenase digerida e as células isoladas cultivadas sob condições assépticas para o uso em ensaios *in vitro*, com uma composição celular predominantemente de fibroblasto. Os fibroblastos quando estimulados com IL-17A ou TNFα produzem uma faixa de mediadores inflamatórios e destrutivos incluindo citocinas tais como IL-8. Um método detalhado para este ensaio é fornecido na seção Materiais e Métodos de Ensaio.

A IL-17A e TNFα juntos induziram uma resposta de IL-8 sinergizada usando dois conjuntos diferentes de concentrações de citocina. Esta resposta foi reduzida usando anticorpos que neutralizam IL-17A embora

os anticorpos de controle de isótipo não tivessem nenhum efeito sobre a resposta sinergizada.

Tabela 16a: Efeitos dos anticorpos sobre as respostas de IL-8 sinergizadas pela IL-17A (10 ng/ml) e TNFα (1 ng/ml) em fibroblastos sinoviais OA humanos (concentrações de citocina em pg/ml, erro = desvio padrão de pontos de dados em triplicata, n = 1 doador)

	IL-8 (pg/ml)	
Anticorpo (IgG1)	**Média**	**% de Inibição**
IL-17A 10 ng/ml + TNF 1 ng/ml	62519,10	0
IL-17A + TNF + Controle de isótipo hIgG1	64967,81	-3,9
IL-17A + TNF + FORD23A05	32117,64	48,6
IL-17A + TNF + Anticorpo 2	23340,13	62,7
IL-17A + TNF + Anticorpo 7	20829,47	66,7

Tabela 16b: Efeitos de anticorpos sobre as respostas de IL-18 sinergizadas pela IL-17A (1 ng/ml) e TNFα (0,01 ng/ml) em fibroblastos sinoviais OA humanos (concentrações de citocina em pg/ml, erro = desvio padrão de pontos de dados em triplicata, n = 1 doador)

	IL-8 (pg/ml)	
Anticorpo (IgG1)	**Média**	**% de Inibição**
IL-17A 1 ng/ml + TNF 0,01 ng/ml	3255,86	0
IL-17A + TNF + Controle de isótipo hIgG1	3298,59	-1,3
IL-17A + TNF + FORD023A05	1731,59	46,8
IL-17A + TNF + Anticorpo 2	1506,59	53,7
IL-17A + TNF + Anticorpo 7	1107,75	66,0

6.3 Inibição de IL-8 induzida pela IL-17A e IL-17A/TNFα em fibroblastos sinoviais RA

Como esboçado em 6.2, o sinóvio inflamado é um traço chave da RA. O sinóvio da RA também pode ser isolado do tecido de junta removido durante a cirurgia de substituição de junta RA usando os mesmos métodos como descrito. Estas células são relevantes da doença e respondem à

IL-17A e TNFα pela produção de citocinas incluindo IL-8. Uma resposta sinergística é produzida quando ambas as citocinas são adicionadas simultaneamente. Um método detalhado para este ensaio é fornecido na seção Materiais e Métodos de Ensaio.

Tabela 17: Efeitos de anticorpos (IC_{50}s) sobre respostas de IL-8 induzidas pela IL-17A e IL-17A/TNFα em fibroblastos sinoviais RA humanos (dados médios, intervalos de confidência de 95%)

Anticorpo (IgG1) e estimulação	IC_{50} média nM, 95% de CI	n
Anticorpo 7 versus IL-17A (2 nM)	2,85 (1,96 - 4,15)	3
Anticorpo 7 versus IL-17A (1 nM) e TNFα (0,1 ng/ml)	4,97 (1,48 - 16,73)	3

Exemplo 7: O mapeamento de epítopo da ligação de anticorpo 7 à IL-17A humana

7.1 Perturbação da taxa de troca H/D de IL-17A pelo anticorpo 7

No primeiro experimento a IL-17A foi trocada no lugar de D_2O em solução, ligada ao anticorpo 7 (IgG1) imobilizado em uma coluna e depois retro trocada em H_2O enquanto ainda ligada à coluna de anticorpo, resultando no epítopo que é protegido durante a reação de retro troca e conseqüentemente rotulado com deutérios. No segundo experimento a IL-17A foi primeiro ligada ao anticorpo 7 (IgG1) na coluna, depois rotulada com D_2O e finalmente trocada de volta em H_2O enquanto ainda ligado à coluna, tal que nenhuma parte da IL-17A fosse rotulada com deutérios. A diferença nas massas de peptídeos entre os dois experimentos foi depois determinada. A diferença nos níveis de deuteração entre os dois experimentos é uma medida do retardo da troca quando ligado ao anticorpo. Um método detalhado para este protocolo é fornecido na seção Materiais e Métodos.

A IL-17A N-terminalmente identificada foi usada neste estudo com a seqüência mostrada na Fig 1 (SEQ ID NO: 197). Os resíduos de 1 a 21 representam um rótulo de peptídeo que foi adicionado com propósitos de detecção e compreendem "Avitag®", que permite a biotinilação enzimática especificamente em um resíduo de lisina no rótulo. Gly22 é o primeiro

resíduo de IL-17A maduro.

A única região para mostrar uma perturbação significante na taxa de troca de H/D foi entre os aminoácidos 92 a 108 da SEQ ID NO: 197 mostrada na Figura 1 que abrange a seqüência CRHLGCINADGNVDYHM (SEQ ID NO: 199). Esta seqüência corresponde aos resíduos 71 a 87 da IL-17A humana madura (SEQ ID NO: 198).

Tabela 18: Diferença de porcentagem nos níveis de deuteração comparando a deuteração e retro troca para prótons quando ligados ao anticorpo 7 com deuteração em solução e retro troca para prótons quando ligados ao anticorpo. As diferenças de mais do que 10% especialmente nos pontos de tempo mais no início foram considerados ser significantes. A numeração de resíduo é com a seqüência mostrada na Figura 1 (SEQ ID NO: 197)

Número de resíduo		Ponto de Tempo (s)			
início	**fim**	**150**	**500**	**1500**	**5000**
3	8	-5	0	-4	1
11	17	-4	-3	-1	-1
20	44	-3	-3	-1	-3
47	63	-1	-2	-2	-2
66	74	-8	-13	-12	-13
77	89	-1	-1	1	-2
92	108	-23	-21	-15	-13
111	118	-3	-2	-2	-2
121	131	-5	-3	-1	-2
134	137	-3	-2	0	0
140	153	-5	-9	-8	-3

7.2 Análise de ligação de IL-17A mutante para o anticorpo 7

Um segundo método foi obtido para confirmar que o epítopo identificado no Exemplo 7.1 está correto. Isto tirou vantagem da observação de que o anticorpo 7 não se liga à IL-17A de murino embora a IL-17A de murino sinalizará através do receptor de IL-17A humana para induzir a síntese de IL-6. A seqüência de peptídeo identificada no Exemplo 7.1 (CRHLGCINADGNVDYHM, SEQ ID NO: 199) tem sete mudanças entre as seqüências humanas e de murino. Se esta região de fato não contém o epítopo ligado pelo anticorpo 7 então quando todos estes sete resíduos são mudados do resíduo humano para o equivalente de murino então seria esperado que a

IL-17A mutante resultante ainda funcionasse no receptor humano mas não seria mais ligado ou inibido pelo anticorpo 7.

A IL-17A mutante tem as seguintes mudanças (L74Q, G75R, I77V, D80E, N82K, V83L, Y85H) e é mostrada na Figure 2 (SEQ ID NO: 200). Depois da remoção da seqüência de sinal o primeiro resíduo é Gly24. Cinco resíduos de histidina foram adicionados no terminal C para ajudar a purificação. A forma madura da IL-17A humana mutante é a SEQ ID NO: 201.

Conseqüentemente a IL-17A mutante foi clonada e expressada na linhagem de célula HEK/EBNA de mamífero. O meio de cultura foi coletada e a proteína purificada usando cromatografia em Ni. Uma descrição detalhada deste processo é dada na seção Materiais e Métodos. A IL-17A do tipo selvagem foi clonada e depois expressada e purificada pelo mesmo protocolo.

A ligação das moléculas de IL-17A do tipo selvagem e mutante foi analisada usando BIAcore com anticorpo 7 (IgG1) imobilizado em um chip CM5 de acordo com as instruções do fabricante. Isto resultou na imobilização de 5275 Unidades de Resposta (RU).

Tabela 19: Ligação de IL-17A Tipo selvagem e Mutante ao anticorpo 7 imobilizado sobre a superfície do Chip Sensor CM5

Ligando	RU Média (+ SEM)
IL-17A Mutante	8,0 (5,4)
IL-17A do Tipo selvagem	539,1 (0,2)

Não houve nenhuma ligação ao IgG de controle (Cambridge Antibody Technology). A IL-17A do tipo selvagem ligou fortemente ao anticorpo 7 imobilizado. Ao contrário a IL-17A mutante não mostrou nenhuma ligação ao anticorpo 7. O sinal de RU baixo observado pode ser designado como apenas "ruído" de fundo. A ausência de ligação detectável à IL-17A mutante fornece mais evidência de que a seqüência mostrada no Exemplo 7.1 (SEQ ID NO: 199) não contém a pelo menos parte do epítopo

reconhecido pelo Anticorpo 7, isto é, que o anticorpo liga um ou mais resíduos dentro da SEQ ID NO: 199.

7.3 Efeitos de anticorpo sobre a liberação de IL-6 a partir de células HT1080 induzidas pelas formas mutantes de IL-17A

Para determinar a bioatividade da IL-17A mutante (mutantes como descritos no Exemplo 7.2), as respostas foram avaliadas em um ensaio de célula de fibrossarcoma humanas HT1080. Para detalhes do método de ensaio, ver a seção "Materiais e Métodos de Ensaio".

Neste ensaio, as EC_{50}s (concentração dando resposta meia máxima) de IL-17A (*E. Coli*, Peprotech ou derivada de HEK EBNA, doméstica) ou IL-17A mutante (doméstica, derivada de HEK EBNA) na liberação de IL-6 foram avaliadas (Tabela 20a). Em segundo lugar, a atividade inibidora, como determinada pelos seus valores IC_{50}, de IgG anti-IL-17 (até 50 nM) foi determinada em resposta a IL-17A ou IL-17A mutante (concentrações sub-máximas usadas). A potência de anticorpo 7 (como IgG1) como um exemplo contra as várias formas de IL-17A são mostradas na Tabela 20b. A IgG de controle não demonstra inibição da resposta de IL-6 neste ensaio.

Tabela 20a: Exemplos de EC_{50}s da liberação de IL-6 induzida pela IL-17A ou IL-17A mutante no ensaio de HT1080

Ligando	Fonte	EC_{50} (nM)
IL-17A	Peprotech (*E. Coli*)	0,40
IL-17A	Doméstica (HEK EBNA)	0,52
IL-17A Mutante	Doméstica (HEK EBNA)	2,36

Tabela 20b: Exemplos de IC_{50}s de anticorpo 7 contra IL-17A ou IL-17A mutante no ensaio de HT1080

Ligando	**Fonte**	**[Ligando] (nM)**	**Anticorpo 7 IC_{50} (nM)**
IL-17A	Peprotech (*E. Coli*)	1	0,35
IL-17A	Doméstica (HEK EBNA)	2	0,43
IL-17A Mutante	Doméstica (HEK EBNA)	1	Nenhuma inibição

7.4 Determinação da estrutura cristalina de raio X do complexo de anticorpo

de IL-17A

Uma estrutura de IL-17A ligada ao Anticorpo 7 Fab foi determinada pela cristalografia de raio X. Os métodos da produção de Fab, a preparação da proteína de IL-17A, cristalização e cristalografia são apresentados na seção Materiais e Métodos.

Os cristais do complexo de IL-17A / Fab foram obtidos que foram placas finas do grupo do espaço monoclínico $P2_1$. Os dados de difração completos para a resolução em 2,6 Å foram obtidos. A estrutura pôde ser resolvida pela Substituição Molecular usando um fragmento Fab como um modelo de teste, orientando e posicionando deste modo os fragmentos Fab na unidade assimétrica cristalográfica. Houve quatro fragmentos Fab na unidade assimétrica. Houve densidade de elétron adicional na qual o dímero de IL-17A pôde ser modelado. Dois dímeros de IL-17A foram encontrados na unidade assimétrica.

Na estrutura cristalina, cada dímero de IL-17A é ligado a dois fragmentos Fab. O dímero de IL-17A é uma molécula alongada que é caracterizada pelos filamentos beta longos. A estrutura é similar àquela relatada para IL-17F (Hymowitz *et al*, 2001). O dímero de IL-17A é intercalado entre dois fragmentos Fab. Os dois sítios de interação são equivalentes; estes são relacionados pela simetria de dímero de IL-17A. Uma porção do dímero de IL-17A distal dos fragmentos de ligação Fab é perturbada, isto quer dizer que a mesma é flexível e adota orientações diferentes por todo o cristal tal que a densidade de elétron seja calculada em média. Assim, não é possível construir um modelo desta parte do dímero de IL-17A. O complexo, portanto, resulta nas interações do retículo cristalino que são mediadas apenas através das moléculas de Fab. Para usar os descritores usados por Hymowitz *et al.* (2001), os sítios de interação de epítopo estão próximos ao "colar" da estrutura, enquanto que a região da "saia" na extremidade oposta é perturbada.

A estrutura cristalina permite que as interações de epítopo entre IL-17A e Fab sejam examinadas em detalhes atômicos. Estes são mostrados na Tabela 22.

Tabela 22: Interações diretas de IL-17A/Fab

	IL-17A	Fab		Distância [Å]
Ligações de hidrogênio			**Fab Kabat nº**	
	Ser A40 0	Ser H30 OG	H30*	2,9
	Asp A42 N	Ser H31 OG	H31	3,2
	Asp A42 OD1	Thr H28 OG	H28	2,9
	Asp A42 OD1	Tyr H32 OH	H32	2,7
	Arg A46 NH2	Leu H100 0	H96	2,6
	Arg A46 NH1	Ser H31 0	H31	2,8
	Tyr B85 0	Tyr L94 OH	L91	2,5
	His B86 NE2	Ala L30 0	L29	3,0
	Asn B88 OD1	His H102 N	H98	2,8
Não polar (a distância corresponde ao par atômico mais próximo)				
	Ser A40	Thr H28	H28*	3,5
	Ser A41	Thr H28	H28*	3,7
	Tyr A43	Ser H31	H31	3,6
	Ser A41	Ser H31	H31	3,4
	Arg A46	Tyr H32	H32	3,4
	His B86	Asn L31	L30	3,5
	His B86	Tyr L32	L31	3,8
	Tyr B85	Tyr L32	L31	3,7
	His B86	Tyr L33	L32	3,4
	Pro B126	Tyr L33	L32	3,3
	Pro B126	Phe L50	L49*	3,4
	Ile B127	Gln L54	L53	3,2
	Tyr B85	Pro L96	L93	3,7
	Leu B74	Pro L96	L93	3,6
	Leu B74	Tyr H59	H58	3,6
	Pro B126	Leu H100	H96	3,6
	Asn B88	Ile H101	H97	3,4
	Met B87	Ile H101	H97	3,8
	His B86	Ile H101	H97	3,8
	Leu B74	His H102	H98	3,9

Na Tabela 22, o número de resíduo contêm um indicador de cadeia (H: Cadeia pesada Fab, L: Cadeia leve Fab, A: monômero A em IL-17A, B: monômero B em IL-17A). A numeração de resíduo de IL-17A corresponde à seqüência madura SEQ ID NO: 198. A numeração de resíduo dos domínios Fab VH e VL correspondem à SEQ ID NO: 62 e SEQ ID NO: 176 respectivamente. A numeração do resíduo Kabat para o Fab também é mostrada. * Os asteriscos indicam resíduos de matriz Fab. O corte de distância usado para ligações de hidrogênio é de 3,2 Å, para as interações não polares 4,0 Å.

As distâncias foram obtidas usando o programa CONTACT da CCP4 (CCP4, 1994). É apenas necessário descrever um dos dois sítios de interações, visto que eles são equivalentes. As interações envolvem as regiões determinadoras de complementaridade (CDRs) tanto a cadeia Pesada quanto a Leve do fragmento de anticorpo e resíduos de aminoácido de ambos os monômeros no dímero de IL-17A. A cadeia Pesada de anticorpo interage tanto com a cadeia A quanto com a B no dímero de IL-17A, enquanto que a cadeia Leve interage apenas com o monômero B. Os resíduos de aminoácido em IL-17A que formam parte do sítio de interação são Ser40 a Tyr43 inclusive e Arg46 na cadeia A e Leu74, Pro91, Tyr85 a Asn88 e Pro126 a Ile127 na cadeia B do dímero. Os resíduos contribuídos a partir da cadeia Leve de Fab são Ala30 a Tyr33, inclusive, Phe50, Gln54, Tyr94 e Pro96. Os resíduos da cadeia Pesada são Thr28, Ser30 a Tyr32, Tyr59 e L100 a H102. Assim, em IL-17A, doze aminoácidos formam o sítio de epítopo, que interage com dezesseis resíduos de aminoácido no anticorpo. As interações incluem 9 ligações de hidrogênio e interações de van der Waals não polares (também chamadas de interações hidrofóbicas). Algumas das interações hidrofóbicas incluem as interações de empilhamento eletrônico, que envolvem os elétrons pi em um sistema aromático.

A examinação da estrutura cristalina indicou que alguns dos resíduos do Fab que parecem interagir com IL-17 puderam ser substituídos no lugar de outros resíduos que manteriam uma interação.

Por exemplo, a ligação de hidrogênio entre Ala30L (o resíduo Kabat 29 na LCDR1) e a IL-17 é pelo oxigênio da cadeia principal da alanina e não envolve a cadeia lateral de Ala, que está localizada na superfície do membro de ligação. Isto indica que outros resíduos de aminoácido puderam ser substituídos no lugar de Ala nesta posição sem a perda da interação e assim não resultariam na perda de afinidade do membro de ligação para IL-17A.

As ligações de hidrogênio também são formadas entre átomos

da cadeia principal do membro de ligação em Ser31H, Leu100H, Ala30L e His102H, indicando que outros resíduos poderiam ser substituídos nestas posições sem perder estas ligações de hidrogênio.

A cadeia principal C-alfa de Asn31L (o resíduo Kabat 30 em LCDR1) forma uma interação não polar com IL-17, que também não seria afetada pela substituição deste resíduo.

Os seguintes são além disso, exemplos não exaustivos, exemplos de resíduos que são indicados interagir com IL-17, com base em uma examinação da estrutura e consideração dos locais e natureza das interações e restrições estéricas:

- Ser, Ala, Gly, Thr ou Cys no resíduo Kabat 31 de HCDR1
- Tyr no resíduo Kabat 32 de HCDR1
- Tyr ou Phe no resíduo Kabat 58 de HCDR2
- um resíduo hidrofóbico, por exemplo, Leu, Ile, Val, Ala ou Phe, no resíduo Kabat 96
- um resíduo hidrofóbico, por exemplo, Ile, Leu, Val, Ala ou Phe, no resíduo Kabat 97 de HCDR3
- um resíduo cíclico, por exemplo, His, Trp ou Phe no resíduo Kabat 98 de HCDR3
- Tyr ou Phe no resíduo Kabat 31 de LCDR1
- Tyr ou Phe no resíduo Kabat 32 de LCDR1
- um resíduo polar, por exemplo, Gln, no resíduo Kabat 53 de LCDR2
- Tyr no resíduo Kabat 91 de LCDR3
- Pro, hidroxiprolina, His, 3-metilistidina ou Asp no resíduo Kabat 93 de LCDR3
- Thr ou Ser no resíduo Kabat 28 na FR1 de cadeia pesada
- Ser ou Thr no resíduo Kabat 30 na FR1 de cadeia pesada
- um resíduo hidrofóbico, por exemplo, Phe, Tyr ou His no resíduo Kabat 49 na FR2 de cadeia leve.

Tabela 21: Seqüências de CDR dos Anticorpos 1 a 16

	HCDR1					HCDR2																HCDR3											LCDR1												LCDR2							LCDR3								
Numeração de Kabat	31	32	33	34	35	50	51	52	52A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	95	96	97	98	99	100	100A	101	102	24	25	26	27	27A	27B	28	29	30	31	32	33	34	50	51	52	53	54	55	56	89	90	91	92	93	94	95	96	97
Anticorpo 01	S	Y	A	M	S	A	I	S	G	S	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	D	L	I	W	G	V	A	G	S	T	R	S	S	G	S	L	A	N	Y	Y	V	Q	A	N	N	Q	R	P	S	Q	S	Y	D	D	S	S	V	V
Anticorpo 02																																																								P	H			
Anticorpo 03																										H			T	R	N																								S	P	H			
Anticorpo 04																										H			T	R	N																								S	P	T			
Anticorpo 05																										H			T	R	N																								N	H	K	D	I	
Anticorpo 06																																																								S	P				
Anticorpo 07																										H			T	R	N																											P	Y			
Anticorpo 08																																																								N	H	K	D	I	
Anticorpo 09																										F			G		G																										S	P	H			
Anticorpo 10																										F			G		G																											P	H			
Anticorpo 11																																																								S	P	H			
Anticorpo 12																										F			G		G																											P	Y			
Anticorpo 13																																																										P	R	V			
Anticorpo 14																																																										P	T	N	Q		
Anticorpo 15																																																								S	P	T			
Anticorpo 16																																																										P	Y			

Materiais e Métodos de Ensaio

Células HEK EBNA

As células HEK EBNA (ATCC cat nº CRL-10852) foram obtidas da Invitrogen.

Concentrações de IL-17

Em todos os ensaios descritos abaixo e aqui em outro lugar, as concentrações de IL-17A ou homólogos de IL-17 referem-se à concentração do homodímero de IL-17 ligado a dissulfeto.

Ensaio HTRF® de ligação de receptor-ligando Ensaio

As produções de seleção foram triadas no formato de ensaio HTRF® de ligação de receptor-ligando (Fluorescência Resolvida pelo Tempo Homogênea) para a inibição da proteína de fusão IL-17RA Fc (R&D Systems 177-IR) que liga IL-17A humana biotinilada (Peprotech 200-17) ou IL-17A humana identificada com HIS FLAG (doméstica derivada de HEK EBNA).

Um ensaio de HTRF® (Fluorescência Resolvida pelo Tempo Homogênea), é uma tecnologia de ensaio homogênea que utiliza a transferência de energia de ressonância de fluorescência entre um fluoróforo doador e aceitador que estejam em proximidade imediata. Tais ensaios podem ser usados para medir interações macromoleculares pela ligação direta ou indiretamente de uma das moléculas de interesse a um fluoróforo doador, criptato de európio (Eu^{3+}) e ligando a outra molécula de interesse a um fluoróforo aceitador XL665, (uma aloficocianina reticulada estável). A excitação da molécula de criptato (a 337 nm) resulta na emissão de fluorescência a 620 nm. A energia desta emissão pode ser transferida a XL665 em proximidade imediata ao criptato, resultando na emissão de uma fluorescência de vida longa específica (a 665 nm) a partir de XL665. Os sinais específicos tanto do doador (a 620 nm) quanto do aceitador (a 665 nm) são medidos, permitindo o cálculo de uma razão de 665/620 nm que compensa quanto à presença de compostos coloridos no ensaio.

As produções foram triadas como extratos periplásmicos contendo scFv não diluído (isolação condutora) ou diluído (otimização condutora), brutos preparados em; 50 mM de tampão MOPS pH 7,4, 0,5 mM de EDTA e 0,5 M de Sorbitol. 3 nM de IL-17A humana biotinilada (6 nM monomérico) ou 3 nM de IL-17A humana identificada por HIS FLAG (6 nM monomérico) foram pré incubadas por 1 hora na temperatura ambiente no escuro, com 3,2 nM de criptato de estreptavidina (CIS Bio International 610SAKLB) ou 1,6 nM de IgG anti-flag rotulada com criptato (CIS Bio International 61GF2KL) respectivamente. Todas as diluições foram feitas em 50 mM de tampão de HEPES contendo 0,4 M de fluoreto de potássio e 0,1% de BSA (tampão de ensaio). Em paralelo, 12 nM de proteína de fusão IL-17RA Fc foram pré incubados por 1 hora na temperatura ambiente no escuro, com 40 nM de anticorpo Fc anti-humano rotulado com XL665 (CIS Bio International 61HFCXLA) em tampão de ensaio.

Depois da pré-incubação dos reagentes, 10 µl de amostra de scFv bruta foi adicionada a uma placa de ensaio de volume baixo de 384 reservatórios (Costar 3676). Isto foi seguido pela adição de 5 µl do receptor pré incubado e mistura XL665 anti-Fc e depois 5 µl da IL-17A humana e mistura de detecção de criptato.

A concentração final de IL-17A usada nos ensaios foi de 0,75 nM.

As placas de ensaio foram depois centrifugadas a 1000 rpm na temperatura ambiente por 1 min e incubadas por 5 horas na temperatura ambiente, antes de ler a fluorescência resolvida com o tempo em comprimentos de onda de emissão de 620 nm e 665 nm usando uma leitora de placa EnVision (Perkin Elmer).

Os dados foram analisados calculando-se os valores de% Delta F para cada amostra. O Delta F foi determinado de acordo com a equação 1.

Equação 1:

$$\%\ \text{Delta F} = \frac{(\text{valor da razão 665 nM / 620 nM da amostra} - (\text{valor da ração 665 nM / 620 nM de controle não específico})}{(\text{valor da ração 665 nM / 620 nM de controle não específico})} \text{x100}$$

Os valores de% Delta F foram subseqüentemente usados para calcular a% de ligação específica como descrito na equação 2.

Equação 2:

$$\%\ de\ ligação\ específica = \frac{\%\ Delta\ F\ da\ amostra}{\%\ Delta\ F\ d\ controle\ de\ ligação\ total} x100$$

scFv purificado a partir de clones positivos identificados a partir da triagem foram testados em ambos os ensaios de HTRF® quanto a inibição da ligação de IL-17A ao receptor de IL-17. Uma titulação de concentrações de scFv foi usada de modo a estabelecer a potência de clone como medido pelos valores IC_{50} no ensaio. Os valores IC_{50} foram determinados usando o software GraphPad Prism pelo ajuste de curva usando uma equação logística de quatro parâmetros (Equação 3).

Equação 3:

Y = Fundo + (Topo - Fundo)/(1+10^((LogEC50 - X)*Inclinação de Hill))

□X é o logaritmo da concentração. Y é ligação específica

□Y começa no Fundo e vai até o Topo com uma forma sigmóide.

Um mAb anti-IL-17 de referência (Biosource) foi incluído em todos os ensaios como um controle positivo.

<u>Ensaio de HTRF® de competição de epítopo para a inibição do anticorpo anti-IL-17A humana que liga HIS FLAG IL-17A humana</u>

Este ensaio de competição de epítopo pode ser usado para determinar a competição entre membros de ligação quanto a ligação de IL-17A. Este ensaio também pode ser usado para determinar a reatividade cruzada de membros de ligação quanto a ligação de IL-17A de espécies diferentes, por exemplo, IL-17A humana e de cinomolgo e/ou reatividade cruzada de membros de ligação a outros membros da família IL-17, por exemplo, os homólogos de IL-17 de A a F. Os membros de ligação testados

neste ensaio estão normalmente no formato scFv, embora a pessoa habilitada possa adaptar o ensaio para o uso com IgG ou outros formatos de membro de ligação. No geral, as concentrações de reagentes variarão dependendo da afinidade do anticorpo para IL-17A.

2 nM de HIS FLAG IL-17A humana (4 nM monomérico) foram pré incubados por 1 hora na temperatura ambiente no escuro, com 1,6 nM de anti-flag IgG rotulado com criptato. Todas as diluições foram feitas em tampão de ensaio. Em paralelo, 0,6 nM de IgG1 anti-IL-17 (contra o qual a competição de um membro de ligação de teste foi testada) foi pré incubado por 1 hora na temperatura ambiente no escuro, com 20 nM de anticorpo Fc anti-humano rotulado com XL665 em tampão de ensaio.

Depois da pré-incubação dos reagentes, 10 µl de amostra foi adicionada a uma placa de ensaio de volume baixo de 384 reservatórios em duplicata. Isto foi seguido pela adição de 5 µl da mistura de HIS FLAG IL-17A humana pré incubada e criptato anti-Flag e depois 5 µl da mistura de anticorpo IL-17 anti-humano e de detecção XL665.

As placas de ensaio foram depois centrifugadas a 1000 rpm na temperatura ambiente por 1 min e incubadas por 2 horas na temperatura ambiente, antes de ler a fluorescência resolvida pelo tempo nos comprimentos de onda de emissão de 620 nm e 665 nm usando uma leitora de placa EnVision (Perkin Elmer).

Os dados foram analisados calculando-se os valores de% Delta F para cada amostra, que foram depois usados para determinar a% de ligação específica.

Os valores IC_{50} foram determinados usando o software GraphPad Prism.

Para o debate de ensaios HTRF no geral, ver o método para o Ensaio de HTRF® da Ligação Receptor-Ligando.

<u>Ensaio da liberação de IL-6 induzida pela IL-17 em HT1080</u>

As células HT1080 (European Collection of Cell Cultures, ECACC - disponível sob ECACC Nº 85111505) foram semeadas em placas de ensaio de cultura de tecido de fundo chato de 96 reservatórios (Costar) a 5 x 10^4 células/reservatórios. As células foram depois cultivadas durante a noite em 200 µl de meio de ensaio (Meio Essencial Mínimo (MEM) com sais de Earles e L-glutamina (Invitrogen), 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS) inativado pelo calor (Invitrogen), 1% (v/v) de MEM-aminoácidos não - essenciais sem L-glutamina (Invitrogen)) em uma atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO_2.

Uma titulação de scFv/IgG purificados foi preparada em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e pré incubado com IL-17A (1 nM de concentração final) em meio de ensaio por 30 a 60 min a 37°C. Em paralelo o meio foi aspirado das células e 100 µl/reservatório de meio de ensaio adicionados. A estes 100 µl/reservatório de amostras foram adicionados e incubados durante a noite (18 horas ± 4 horas). Os sobrenadantes foram colhidos e imediatamente ensaiados ou armazenados a -20°C.

Os níveis de IL-6 nos sobrenadantes foram determinados usando kits de ELISA de IL-6 humano Duoset (R & D Systems). O ELISA foi realizado em placas FluoroNunc Maxisorb revestidas durante a noite com 2 µg/ml de anticorpo (Ab) de captura de IL-6 (diluído em PBS, 100 µl/reservatório). As placas de ELISA foram lavadas três vezes com PBS-Tween e 300 µl de diluente de reagente adicionados (1% de albumina sérica bovina (BSA) em PBS). Depois de 1 hora de incubação na temperatura ambiente (RT) as placas de ELISA foram lavadas como anteriormente descrito. Durante o período de incubação de 1 hora o meio condicionado foi centrifugado a 1200 rpm por 5 min para remover os fragmentos de célula. A seguir da lavagem e preparação da placa do meio condicionado padrões de IL-6 (faixa de concentração 1000 pg/ml - 1 pg/ml) e 170 µl de meio

condicionado foram adicionados às placas de ELISA e incubados na temperatura ambiente por 90 min.

A seguir da incubação, as amostras foram removidas e as placas lavadas como antes. O Ab de detecção de IL-6 a 200 ng/ml em diluente de reagente (100 µl/reservatório) foi depois adicionado às placas e incubadas na temperatura ambiente por 60 min. As placas foram depois lavadas como antes e 100 µl de estreptavidina európio diluídos 1:1000 em tampão de ensaio DELFIA® (Perkin Elmer) e incubados na temperatura ambiente por 60 min. as placas de ELISA foram depois lavadas sete vezes com tampão de lavagem DELFIA® e 100 µl de realce DELFIA® (Perkin Elmer) adicionados. A fluorescência foi quantificada a 615 nm usando leitora de placa Victor (Perkin Elmer) como pelas instruções do fabricantes.

Os dados foram analisados no Excel (Microsoft) pela geração de curvas padrão a partir dos padrões de IL-6 para cada placa e usando isto para calcular a quantidade de IL-6 presente em cada reservatório. Os dados de inibidor também foram normalizados para a porcentagem de liberação de IL-6 máxima usando os valores do IL-6 na ausência de controle de inibidor e nenhum controle de IL-6. Outra análise foi realizada em Prism (GraphPad) onde os dados foram plotados como% da resposta do controle contra a concentração log de scFv/IgG. A determinação dos valores IC_{50} foi calculada usando o software de ajuste de curva Prism (Graphpad).

Ensaio de célula HT1080 que mede a liberação de IL-6 sinergizada

Este ensaio é uma modificação do ensaio de liberação de IL-6 induzida pela IL-17 de HT1080 anteriormente descrito, em que a IL-6 é produzida sinergisticamente em resposta à adição de IL-17A humana e TNFα humano (R&D Systems).

As titulações de scFv/IgG purificado foram preparadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e pré incubadas com IL-17A (125 pM de concentração final de IL-17) em meio de ensaio por 30 a 60 min a

37°C. Em paralelo o meio foi aspirado das células e 100 µl/ reservatório de meio de ensaio contendo TNFα humano foram adicionados (concentração de TNFα final de 25 pM). A isto 100 µl/reservatório de amostras foram adicionados e incubados durante a noite (18 horas ± 4 horas). Os sobrenadantes foram colhidos e ensaiados quanto a IL-6 imediatamente ou armazenados a -20°C.

Os níveis de IL-6 foram medidos pelo ELISA e os dados analisados como anteriormente descrito para o ensaio da liberação de IL-6 induzida pela IL-17 de HT1080.

Geração de IL-17A nativa e efeitos de anticorpos sobre a produção de IL-6 induzida pelos meios condicionados de célula T a partir de células HT1080

200 ml de sangue humano foram coletados em bolsas de sangue com heparina de 3 doadores. O sangue foi disposto em camadas sobre linfoprep (30 ml de sangue sobre 15 ml de linfoprep em tubos Leucosep da Greiner) e centrifugado (2000 rpm, 20 min, temperatura ambiente, sem freio). O plasma foi removido em um tubo fresco, centrifugado e usado para fabricar 5% de plasma autólogo em 0,9% de solução salina estéril. A camada de célula mononuclear (PBMC) na interface foi removida em quatro tubos de centrífuga de 50 ml e o volume em cada tubo dobrado com o meio (RPMI suplementado com 10% de hiFCS, glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (0,1 mg/ml) e 1% de aminoácidos não essenciais).

As PBMCs foram centrifugadas (1800 rpm, 10 min, temperatura ambiente) e as pelotas de célula foram cada uma recolocadas em suspensão em ~15 ml de plasma a 5% e reunidas para cada doador. As PBMCs foram lavadas três vezes (1000 rpm, 10 min) em 5% de plasma de modo a reduzir o número de plaqueta e depois recolocado em suspensão em 2 ml de meio.

As PBMCs foram adicionadas a uma coluna de lã de náilon (Polisciences #425A, antes do uso, embebida em meio e aquecida a 37°C) e

incubadas (1 hora, 37°C). 20 ml de meio foram depois adicionados às gotas à coluna e o efluente, contendo as células T purificadas, foi coletado.

As células T foram estimuladas a 5 x 10^6 células/ml final na presença de anti-CD3/anti-CD28 (Sigma, ambos 1 μg/ml final) TGFP (R & D Systems, 5 ng/ml), IL-23 (R & D Systems, 50 ng/ml), anti-IFNγ (R & D Systems, 10 μg/ml) e reticulador de IgG anti-camundongo de cabra (Sigma, 4 μg/ml). 15 minutos foram deixados depois da adição do anti-CD3/anti-CD28 antes da adição de reticulador. As células T foram estimuladas por 48 horas a 37°C. As células foram centrifugadas (1000 rpm, 5 min) e os sobrenadantes removidos.

As células HT1080 foram semeadas durante a noite a 1,5 x 10^4 células/reservatório em uma placa de 96 reservatórios (Costar) em meio (DMEM suplementado com 10% de hiFCS, glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (0,1 mg/ml) e 1% de aminoácidos não essenciais) em uma atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO_2.

As titulações de anticorpo foram preparadas em meio como acima. Volumes iguais de solução de anticorpo foram misturadas com meio de célula T condicionado e incubados (37°C, 1 hora). O meio foi removido das células e substituído com soluções de anticorpo e as células foram incubadas durante a noite. Os sobrenadantes foram colhidos, armazenados a -20°C até a análise usando o ELISA de IL-6 como descrito (Cytoset, Biosource). Os valores de IL-6 foram plotados usando Origin v7.5 (OriginLab Corporation) para calcular valores IC_{50} para a inibição da liberação de IL-6 comparada com as respostas na ausência de anticorpo.

<u>Ensaio de Liberação de IL-6/IL-8/MMP13/PGE_2 de Condrócito</u>

A cartilagem foi obtida depois da substituição da junta do joelho a partir de pacientes com osteoartrite sob a aprovação de comitês de ética locais. As amostras foram digeridas durante a noite em 2 mg/ml de colagenase a 37°C. Depois da digestão, os condrócitos foram expandidos em

frascos de cultura contendo meio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado com 10% de soro de bezerro fetal, penicilina (100 unidades), estreptomicina (0,1 mg/ml), L-glutamina (2 mM), anfoteracina B (2,5 μg/ml) e aminoácidos não essenciais (1X). Quatro linhas de célula separadas foram cultivadas e usadas na passagem 1. Os condrócitos foram colhidos, plaqueados em placas de 96 reservatórios a uma densidade de 1,5 x 10^4 células/reservatório em meio de cultura e deixadas aderir durante a noite a 37°C, 5% de CO_2.

Os anticorpos anti-IL-17A foram diluídos no meio de ensaio (meio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado com 2% de soro de bezerro fetal, penicilina (100 unidades), estreptomicina (0,1 mg/ml), L-glutamina (2 mM) e aminoácidos não essenciais (1X)) em uma faixa de concentrações (variando de 0,08 a 400 nM). A IL-17A humana recombinante (doméstica ou Peprotech derivada de *E. coli*) foram diluídos em meio de ensaio e testados nas concentrações finais de 0,2 e 2 nM. A IL-17A recombinante foi adicionada às soluções de anticorpo anti-IL-17 e pré incubada por 1 hora. O meio foi removido dos condrócitos e 100 μl de mistura de IL-17 recombinante/anticorpo anti-IL-17A foram adicionados. Os sobrenadantes de cultura foram coletados depois de uma incubação de 24 horas. IL-6, IL-8, MMP13 e PGE_2 humanos foram medidos pelo ELISA.

ELISA para a detecção da produção de IL-6 humano:

A IL-6 foi medida pelo ELISA, Cytoset (Biosource, CHC1264) seguindo as instruções do fabricante. Em resumo, as placas de ELISA foram revestidas com um anticorpo de IL-6 monoclonal (1 μg/ml) durante a noite a 4°C e bloqueadas com 1% de tampão de BSA/bicarbonato. As placas foram lavadas com 0,05% de Tween 20/PBS e incubadas com sobrenadantes de cultura de condrócitos humanos e um anticorpo anti-huIL-6 de camundongo conjugado com biotina (0,4 μg/ml) por 2 horas na temperatura ambiente. Depois de lavar, a IL-6 foi detectada usando-se

estreptavidina conjugada com peroxidase de rábano (1:2500). As placas foram desenvolvidas usando 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. A reação foi interrompida com H_2SO_4 2 M e as densidades ópticas foram determinadas a 450 nm usando uma leitora de placa PHERAstar.

ELISA para a detecção da produção de IL-8 humana:

A IL-8 foi medida pelo ELISA, Cytoset (Biosource, CHC1304) seguindo as instruções do fabricante. Em resumo, as placas de ELISA foram revestidas com um anticorpo IL-8 monoclonal (1 μg/ml) durante a noite a 4°C e bloqueado com 1% de tampão de BSA/ bicarbonato. As placas foram lavadas com 0,05% de Tween 20/PBS e incubadas com sobrenadantes de cultura de condrócitos humanos e um anticorpo anti-huIL-8 de camundongo conjugado com biotina (0,1 μg/ml) por 2 horas na temperatura ambiente. Depois de lavar, a IL-8 foi detectada usando-se estreptavidina conjugada com peroxidase de rábano (1:5000). As placas foram desenvolvidas usando 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina. A reação foi interrompida com H_2SO_4 2 M e as densidades ópticas foram determinadas a 450 nm usando uma leitora de placa PHERAstar.

ELISA para a detecção da produção de MMP13 humana:

As placas de ELISA foram revestidas com anticorpo monoclonal anti-huMMP13 de camundongo (R & D Systems, MAB511: 1 μg/m1) em tampão de fosfato durante a noite a 4°C. as placas foram bloqueadas com 2% de tampão de BSA/fosfato seguido pela lavagem com 0,05% de Tween 20/PBS e incubadas com sobrenadantes de cultura de condrócitos humanos mais anticorpo policlonal anti-huMMP13 de coelho (Abcam 9128: diluição 1:2500) por 2 horas a 37°C. Depois de lavar, MMP13 foi detectada usando um IgG anti-coelho conjugada à peroxidase de rábano (Amersham Biosciences NA934: 1:2500).

As placas foram desenvolvidas usando 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina. A reação foi interrompida com H_2SO_4 2 M e as densidades ópticas

foram determinadas a 450 nm usando uma leitora de placa PHERAstar.

ELISA para a detecção da produção de PGE_2 humano:

As placas de ELISA foram revestidas com IgG anti-coelho de camundongo (Sigma, R2004: 10 µg/ml) durante a noite a 4°C. as placas foram lavadas com 0,05% de Tween 20/PBS e incubadas com sobrenadantes de cultura a partir de condrócitos humanos, Prostaglandina AChE Tracer (Cayman Chemicals, 414010) e PGE_2 anti-soro (preparados em casa, 1:50.000) durante a noite na temperatura ambiente. Depois da lavagem, as placas foram desenvolvidas usando reagente de Ellman (Cayman chemicals, 400050) e as densidades ópticas foram determinadas a 405 nm usando uma leitora de placa PHERAstar.

Ensaio de sinergia de IL-17 em explantes de cartilagem *post mortem*

As amostras de joelho *post-mortem* foram obtidas em Meio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), do Kings Mill Hospital, Nottingham com total aprovação ética. Cada joelho foi dissecado usando bisturi #22 em condições estéreis. A cartilagem foi isolada como pedaços profundos completos onde possível. Os discos de explantes foram cortados usando furadores de rolha (5 mm) e plaqueados como 1 explante por reservatório de uma placa de 96 reservatórios em 220 µl de meio (DMEM (isento de vermelho fenol) suplementado com penicilina (100 U/ml), estreptomicina (0,1 mg/ml), glutamina (2 mM), 1% de aminoácidos não essenciais e gentamicina (1 µg/ml)). Os explantes foram repousados por 3 dias antes da estimulação. Cada condição teve 12 explantes duplicados.

Os estímulos usados foram meio sozinho, IL-17A (Peprotech) a 10 ng/ml, TNFα (Peprotech) a 1 ng/ml sozinhos ou em o todos diluídos em meio contendo sulfato de polimixina B (2 µg/ml). Anticorpos neutralizantes anti IL-17A e seus controles de isótipo (IgG_1 de camundongo (R & D Systems), IgG_1 humano CAT002 (Cambridge Antibody Technology Limited)) foram diluídos em meio contendo 2 µg/ml de polimixina B a 50 nM

para os experimentos iniciais e de 0,5 a 50 nM para experimentos de IC_{50}. Os anticorpos foram misturados com citocinas onde indicado e todas as soluções foram incubadas antes da adição aos explantes (37°C, 30 Min).

Os meios foram removidos dos explantes e substituídos com 220 µl de meio de estimulação. As placas foram incubadas por 72 horas (37°C, atmosfera umidificada) antes de remover os sobrenadantes para armazenagem a -20°C. O teor de IL-6 foi analisado pelo ELISA (Cytoset, Biosource) de acordo com as instruções do fabricante e como descrito no Exemplo 3 (Afinidade de anticorpos para IL-17A humana). Os valores foram calculados usando Origin v7.5 (OriginLab Corporation).

Ensaio de sinergia de IL-17A em fibroblastos sinoviais OA

As amostras de joelhos com osteoartrite de substituições de junta totais foram obtidos em DMEM do Kings Mill Hospital, Nottingham com aprovação ética total. Cada joelho foi dissecado usando bisturi #22 em condições estéreis. O sinóvio inflamado foi dissecado da junta e colocado em frascos T75cm2 estéreis. Os pedaços de sinóvio foram incubados por 24 horas em solução de colagenase (2 mg/ml) em DMEM, suplementado com penicilina (100 U/ml), estreptomicina (0,1 mg/ml), glutamina (2 mM), 1% de aminoácidos não essenciais e anfoteracina B (2,5 µg/ml) em um incubador umidificado mantido a 37°C.

A suspensão de célula de sinóvio digerida foi coada de célula, lavada e as células cultivadas em DMEM, suplementado com penicilina (100 U/ml), estreptomicina (0,1 mg/ml), glutamina (2 mM), 1% de aminoácidos não essenciais e anfoteracina B (2,5 µg/ml) em um incubador umidificado mantido a 37°C. As células foram passadas a cada 1 a 2 semanas e usadas na passagem 2. As células foram descoladas do frasco usando tripsina-EDTA e plaqueadas em uma placa de 96 reservatório a 1,5 x 10^4 células por reservatório e usadas 1 dia depois de plaquear.

Os estímulos usados foram meio sozinho, IL-17A (Peprotech),

TNFα (Peprotech) sozinhos ou em combinação. Anticorpos neutralizadores anti-IL-17A e seu controle de isótipo (IgG_1 de camundongo (R & D Systems), IgG1 humano CAT002 (Cambridge Antibody Technology Limited)) foram diluídos em meio contendo 1 μg/ml de polimixina B a 50 nM. Os anticorpos foram misturados com citocinas onde indicado e todas as soluções foram incubadas antes da adição aos explantes (37°C, 30 min).

Os meios foram removidos das células e substituídos com 100 μl de meio de estimulação. As placas foram incubadas por 24 horas (37°C, atmosfera umidificada) antes da remoção dos sobrenadantes para armazenagem a -20°C. O teor de IL-8 foi analisado pelo ELISA (Cytoset, Biosource) de acordo com as instruções do fabricante e como descrito no Exemplo 3 (Afinidade de anticorpos para IL-17A humana). Os valores foram calculados usando Origin v7.5 (OriginLab Corporation).

Inibição de IL-8 induzida pela IL-17A e IL-17A/TNFα em fibroblastos sinoviais de RA

Amostras de joelhos com artrite reumatóide a partir de substituições de junta total foram obtidas na AstraZeneca R&D Charnwood, com aprovação ética total. Os fibroblastos sinoviais RA foram dados à AstraZeneca R&D Alderley Park na passagem 2. As células foram cultivadas em frascos T225 cm^2 em DMEM, suplementado com 10% de FCS (Hyclone), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (0,1 mg/ml), glutamina (2 mM), 1% de aminoácidos não essenciais e gentamicina (1 μg/ml) em um incubador umidificado mantido a 37°C.

As células foram passadas a cada 1 a 2 semanas e usadas na passagem 5. As células foram descoladas do frasco usando tripsina-EDTA e plaqueadas em uma placa de 96 reservatórios a 5 x 10^3 células por reservatório e usadas 3 dias depois de plaquear.

Os estímulos usados foram meios sozinhos, IL-17A (Peprotech), sozinha ou em combinação com TNFα (R&D Systems). Os

anticorpos neutralizadores anti-IL-17A e seu controle de isótipo (IgG1 de camundongo (R & D Systems), IgG1 humano CAT002 (Cambridge Antibody Technology Limited)) foram diluídos em meios contendo 1 μg/ml de polimixina B a 50 nM. Os anticorpos foram misturados com citocinas onde indicado e todas as soluções foram incubadas antes da adição aos fibroblastos (37°C, 30 min).

Os meios foram removidos das células e substituídos com 100 μl de meio de estimulação. As placas foram incubadas por 24 horas (37°C, atmosfera umidificada) antes de remover os sobrenadantes para armazenagem a -20°C. O teor de IL-8 foi analisado pelo ELISA (Cytoset, Biosource) de acordo com as instruções do fabricante e como descrito no Exemplo 3 (Afinidade de anticorpos para IL-17A humana). Os valores de IL-8 foram plotados para gerar valores IC_{50} que foram calculados usando Origin v7.5 (OriginLab Corporation).

Análise de pA_2

A ferramenta farmacológica principal para quantificar a afinidade de um antagonista competitivo é a análise de Schild. Usando este método um meio independente do sistema de estimar a afinidade do antagonista em um ensaio funcional pode ser determinado. O método é fundamentado no conceito de que a concentração de antagonista e a sua afinidade determina o antagonismo da resposta de agonista. Porque o antagonismo pode ser quantificado e a concentração do antagonista é conhecida, a afinidade do antagonista pode ser determinada. Este antagonismo é quantificado pela medição da razão de concentrações eqüitativas de agonistas, medidas na presença e ausência do antagonista, aludidas como razões de dose (DR).

As razões de dose podem ser calculadas tomando-se a razão da EC_{50} do agonista (tipicamente IL-17A) na ausência do membro de ligação para o EC_{50} do agonista na presença de uma concentração única de membro

de ligação. As razões de dose, expressadas como log(DR-1) podem ser depois usadas em uma regressão linear no log[membro de ligação] para produzir uma regressão de Schild. Assim, para cada concentração de membro de ligação haverá um valor DR correspondente; estes são plotados como a regressão de log(DR-1) no log [membro de ligação]. Se o antagonismo é competitivo, haverá uma relação linear entre o log (DR-1) e o log [membro de ligação] de acordo com a equação de Schild em que a equação é como segue

$$\text{Log(DR-1)} = \log [B] - \log K_B$$

[B] é a concentração molar do membro de ligação.

Sob estas circunstâncias, um valor de zero para a ordenada dará uma intercepção do eixo x onde log [B] = log K_B. Portanto a concentração de membro de ligação que produz um log (DR-1) = 0 será igual ao log KB, a constante de dissociação de equilíbrio do complexo de membro de ligação-receptor. Este é uma quantificação independente de sistema para a estimativa da afinidade do membro de ligação. Tradicionalmente, este método é usado para determinar a afinidade de antagonistas de receptor, entretanto com base em hipóteses similares quanto a neutralização de ligando, um cálculo da razão de dose deve permitir a estimativa da afinidade do membro de ligação para neutralizar a atividade de IL-17 também em células. Porque os valores KB são obtidos a partir de uma plotagem logarítmica, eles são log normalmente distribuídos. O logaritmo negativo desta concentração particular é aludida empiricamente como pA_2, a concentração de antagonista que produz uma mudança de duas vezes da curva de dose resposta do agonista. A potência do antagonista pode ser quantificada calculando-se pA_2 a partir de uma única concentração de antagonista que produz um único valor para a razão de dose a partir da equação, em que

$$pA_2 = \log (\text{DR-1}) - \log[B]$$

[B] = concentração molar de antagonista que torna necessário dobrar a concentração de agonista para evocar a resposta submáxima original.

DR = a razão de dose é quantificada medindo-se a razão de concentrações eqüitativas de agonista medida na presença e ausência do antagonista.

pA_2 pode ser calculado a partir dos dados do ensaio de dose-resposta.

Método de ensaio usado para a análise de pA_2 para calcular a afinidade de anticorpos para IL-17A humana

As células HT1080 (European Collection of Cell Cultures, ECACC) foram semeadas em placas de ensaio de cultura de tecido de fundo chato de 96 reservatórios (Costar) a 5 x 10^4 células/reservatório. As células foram depois cultivadas durante a noite em 200 µl de meio de ensaio (MEM com sais de Earles e L-glutamina, 10% (v/v) de FBS Australiano inativado por calor, 1% (v/v) de MEM-aminoácidos não essenciais (sem L-glutamina), Invitrogen)) / reservatório em uma atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO_2.

Uma titulação de IL-17A (faixa de concentração final 1 µM a 7 pM) foi depois preparada em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e pré incubada com IgG purificada (faixa de concentração de Ab final usada de 270 nM a 270 pM) em meio de ensaio por 30 a 60 min a 37°C. Em paralelo o meio foi aspirado das células e 100 µl/reservatório de meio de ensaio adicionado. A estes 100 µl/reservatório de amostras foram adicionados e incubados durante a noite (18 horas ± 4 horas). Os sobrenadantes foram colhidos e imediatamente ensaiados ou armazenados a -20°C.

Os níveis de IL-6 em sobrenadantes foram determinados usando kits de ELISA Hu IL-6 Duoset (R & D Systems). O ELISA foi realizado em placas FluoroNunc Maxisorb revestidas durante a noite com 2 µg/ml de anticorpo (Ab) de captura de IL-6 (diluído em PBS, 100 µl/reservatório). As placas de ELISA foram lavadas três vezes com PBS-Tween e 300 µl de diluente de reagente adicionados (1% de albumina sérica

bovina (BSA) em PBS). Depois de 1 hora de incubação na temperatura ambiente (RT) as placas de ELISA foram lavadas como antes. Durante o período de 1 hora de incubação o meio condicionado foi centrifugado a 1200 rpm por 5 min para remover os fragmentos de célula. A seguir da lavagem da placa e preparação do meio condicionado os padrões de IL-6 (faixa de concentração de 1000 pg/ml a 1 pg/ml) e 170 µl de meio condicionado foram adicionados às placas de ELISA e incubadas na temperatura ambiente por 90 min. A seguir da incubação, as amostras foram removidas e as placas lavadas como antes. O Ab de detecção de IL-6 a 200 ng/ml em diluente de reagente (100 ml/ reservatório) foram depois adicionados às placas e incubados na temperatura ambiente por 60 min. as placas foram depois lavadas como antes e 100 µl de estreptavidina európio diluído 1:1000 em tampão de ensaio DELIA® (Perkin Elmer) e incubados na temperatura ambiente por 60 min. As placas de ELISA foram depois lavadas sete vezes com tampão de lavagem DELFIA e 100 µl de realce DELFIA (Perkin Elmer) adicionados. A fluorescência foi quantificada a 615 nm usando a leitora de placa Victor (Perkin Elmer) como pelas instruções dos fabricantes.

Os dados foram analisados no Excel (Microsoft) pela geração de curvas padrão para os padrões de IL-6 adicionados para cada placa e usando estas para calcular a quantidade de IL-6 presente em cada reservatório. As curvas dependentes da concentração foram normalizadas para a porcentagem de liberação máxima de IL-6 usando os valores da IL-6 na ausência de controle de inibidor. Outra análise foi realizada no Prism (GraphPad Software) onde os dados foram plotados como% da resposta de controle contra a concentração log de IgG e os valores IC_{50} foram gerados usando o software de ajuste de curva Prism (Graphpad). As inclinações de Hill da curva dependente da concentração foram calculadas em média e fixadas para calcular as razões de dose. Estas foram usadas para gerar plotagens de Schild (também no Prism) e os valores de Kd estimados a partir

de valores de pA_2.

Perturbação da taxa de troca H/D de IL-17A pelo membro de ligação

A IL-17A identificada foi usada a 0,5 mg/ml em 50 mM de Tris.HCl pH 7,4, 150 mM de NaCl. O anticorpo foi usado a 10,6 mg/ml em PBS (1,54 mM de KH_2PO_4, 2,71 mM de Na_2HPO_4, 155 mM de NaCl pH 7,2). O anticorpo foi ligado à resina POROS AL (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante para preparar uma coluna de 100 µl que foi mantida a 1°C.

A coluna foi lavada em 50 mM de Tris.HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl preparados em 75% de D_2O. A IL-17A foi diluída em tampão preparado com 75% de D_2O a 0,125 mg/ml e incubados por 150, 500, 1500 e 5000 segundos antes da injeção na coluna de anticorpo. A coluna foi rapidamente lavada com 0,2 ml de tampão em H_2O e depois incubada pelo mesmo período de tempo isto é, a amostra que foi trocada em D_2O por 150 segundos foi trocada de volta para H_2O por 150 segundos e similarmente para as amostras a 500, 1500 e 5000 segundos. Os pontos de tempo diferentes foram eluídos pela injeção primeiro de 80 µl e depois 40 µl de ácido fórmico a 0,8%. Os últimos 40 µl foram coletados e 20 µl de uréia 2 M, TCEP 1 M pH 3 a 1°C adicionados. A mistura inteira foi injetada sobre uma coluna de 100 µl contendo pepsina para digerir a proteína em peptídeos que foram separados pela rpHPLC usando um gradiente de acetonitrila de 12 a 28,5% e as massas determinadas tanto em um espectrômetro de massa de eletropulverização Thermo Finnigan LCQ e um espectrômetro de massa Micromass Q-TOF. O programa de software SEQUEST (Thermo Finnigan San Jose, CA) foi usado para identificar seqüências dos íons de peptídeo precursor.

O efeito do anticorpo sobre a taxa de troca de partes diferentes de IL-17 foi determinado essencialmente como descrito acima, com as seguintes exceções: a IL-17 foi primeiro diluída a 0,125 mg/ml em tampão contendo H_2O, depois injetada na coluna que foi pré-lavada com 50 mM de

Tris.HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl preparados em H_2O. Depois da ligação, a coluna foi lavada com 50 mM de Tris.HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl preparada em H_2O e depois incubadas com 50 mM de Tris.HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl preparada em 75% de D_2O por 150, 500, 1500 e 5000 segundos antes de serem trocadas de volta em H_2O e tratadas como acima.

Clonagem, expressão e purificação de construção de IL-17A mutante

A IL-17A mutante foi clonada com um rótulo de Histidina de terminal C usando a tecnologia Gateway® (Invitrogen) e métodos de mutagênese convencionais (usando o kit de mutagênese de sítio múltiplo da Stratagene) ou a reação da cadeia da polimerase. O gene clonado foi inserido no vetor de expressão pCEP4 usando a reação da LR Clonase.

IL-17A do tipo selvagem e mutante com rótulos His de terminal C foram expressadas em células HEK293/EBNA. As células foram transfectadas com 30 μg de DNA por frasco T162 quando as células foram 60 a 70% confluentes. O reagente de transfecção PEI (da Sigma) foi usado e as células foram incubadas durante a noite antes que o meio fosse removido e substituído com meio fresco sem soro e incubados por um adicional de 72 horas. Os sobrenadantes destas células foram coletados e usados para a purificação de cada proteína recombinante.

O sobrenadante das células HEK293/EBNA transfectadas foi coletado e o pH ajustado a 7,4 antes da purificação pela cromatografia de afinidade em Ni-Sepharose Fast Flow (GE HealthCare). A proteína purificada foi dialisada em tampão de PBS e analisada pela SDS-PAGE, pelo seqüenciamento de terminal N de Edman e Western blotting usando anticorpos de anti-histidina como ferramentas de detecção. A identidade das proteínas foi confirmada antes de começar a ligação e os estudos funcionais. A concentração foi determinada por uma combinação da absorbância a 280 nm e a intensidade de tingimento pelo azul de Coomassie em SDS-PAGE.

Experimentos de ligação de BIAcore de IL-17A tipo selvagem e mutante

Anticorpos a 100 µg/ml foram imobilizados à superfície de um Chip Sensor CM5 (BIAcore Cat #BR-1033-99) usando BIAcore 3000 e kit de ligação de amina (BIAcore Cat# BR-1000-50) de acordo com as instruções do fabricante. A linha de base foi regenerada pela regeneração ácida usando 10 mM de Glicina pH 1,5. Antes de cada experimento a linha de base foi estabelecida e os ligandos (a 25 nM) foram injetados na superfície do chip por 7 minutos na taxa de 10 µl/min. A quantidade de IL-17A ligada foi determinada medindo-se o sinal (RU) 30 s antes e 60 s depois da injeção e subtraindo-se o primeiro do último.

Ensaio de liberação de IL-6 induzida pela IL-17 de HT1080 (estudos de mapeamento de epítopo)

As células HT1080 (European Collection of Cell Cultures, ECACC - ECACC Nº 85111505) foram semeadas em placas de ensaio de cultura de tecido de fundo chato de 96 reservatórios (Costar) a 5 x 10^4 células/reservatório. As células foram depois cultivadas durante a noite em 200 µl de meio de ensaio (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) com L-glutamina (Invitrogen), 1% de penicilina e estreptomicina, 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS) inativado pelo calor (Hyclone), 1% (v/v) MEM-aminoácidos não essenciais sem L-glutamina (Invitrogen)) em uma atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO_2.

As titulações do anticorpo de interesse ou IgG de controle foram preparadas em meio de ensaio (faixa de concentração final 50 a 0,03 nM) e pré incubadas com IL-17A ou formas mutantes de IL-17A (concentrações finais como esboçadas na Tabela 20b, faixa de 1 a 2 nM) por 30 a 60 min a 37°C. Adicionalmente as curvas de titulação de IL-17A ou IL-17A mutante sozinhos foram preparadas para avaliar a responsividade das células aos ligandos.

Os meios foram aspirados das células e 100 µl/reservatório de

anticorpo incubado e IL-17A (ou IL-17A mutante) ou IL-17A sozinhos adicionados e incubados durante a noite (18 horas ± 4 horas). Os sobrenadantes foram colhidos e imediatamente ensaiados ou armazenados a -20°C. Os pontos de dados foram em triplicata dentro do experimento.

Os níveis de IL-6 nos sobrenadantes foram determinados como esboçado em "Ensaio de liberação de IL-6/IL-8/MMP13/PGE_2-em Condrócitos" Materiais e Métodos.

Os valores desconhecidos foram extrapolados a partir de uma curva padrão usando 'Standard Calibration and calculations of unknowns' e IC_{50}s foram calculadas usando 'Dose Response - 1 - 15 sets' dentro do Origin v7.5 (OriginLab Corporation).

Produção e Análise de Anticorpo 7 Fab para a cristalografia de raio X

O Anticorpo 7 purificado foi digerido para gerar fragmentos Fab como segue:

- Um tampão de digestão de 30 mM de cloridreto de DL-cisteína dissolvido em GIBCO PBS (Invitrogen) foi preparado.

- Papaína da papaya latex (Sigma) foi reconstituída em tampão de digestão para dar uma solução de 10 mg/ml e mantida na temperatura ambiente por um mínimo de 30 minutos antes do uso.

- Cisteína foi adicionada à IgG para dar uma solução a 30 mM.

- Papaína foi adicionada à IgG a uma razão de 1 mg de papaína para 100 mg de IgG

- A digestão foi terminada depois de 4 horas pela adição de 0,5 M de iodoacetamida (Sigma) para dar 50 mM de iodoacetamida na mistura de digestão final.

O Fab foi depois purificado, o tampão trocado em PBS pH 7,2 e concentrado a aproximadamente 10 mg/ml para o uso na cristalografia de raio X, que é descrita abaixo.

Determinação da estrutura cristalina por raio X: Preparação de proteína,

cristalização e cristalografia

A IL-17A humana recombinante foi expressada na *E. coli* e os corpos de inclusão isolados usando métodos bem descritos (Rudolph *et al* 1996). A proteína do corpo de inclusão foi solubilizado pela homogeneização em tampão de solubilização (50 mM de Tris pH 8,5, 6 M de Guanidina HCl, 10 mM de DTT) na temperatura ambiente por 1 hora. A proteína solubilizada foi redobrada a 0,5 mg/ml de concentração final pela diluição rápida pela adição ás gotas ao tampão de redobra com agitação vigorosa (0,1 M de CAPSO pH 9,5, 0,9 M de Arginina e 0,3:0,03 mM de glutationa reduzida:oxidada) na temperatura ambiente e deixada repousar durante a noite. A proteína redobrada foi concentrada 5 vezes usando um cartucho em espiral MWCO de 10 KDa (Sistema de fluxo tangencial Amicon proflux® M12). A proteína concentrada foi purificada em colunas de exclusão de tamanho S75 (GE Healthcare Biosciences) equilibrada com tampão de exclusão de tamanho (50 mM de Tris pH 7,4, 0,15 M de NaCl).

A filtração em gel analítica foi realizada usando um Ettan LC (GE Healthcare) adaptado com uma coluna Superdex 200 PC 3.2/30 (GE Healthcare) de modo a identificar a razão de mistura que resultaria na produção máxima do complexo IL-17A / Fab. A coluna foi equilibrada com tampão de filtração em gel (BTP 25 mM, pH 7,0, NaCl 100 mM) antes de carregar amostras de 35 µl a 50 $\mu l.min^{-1}$. Uma razão de 3,6:1 de IL17A:Fab produziu a produção máxima de complexo usando os materiais descritos. IL-17A e Fab foram depois misturados entre si nesta razão e concentrados usando um concentrador centrífugo de corte de peso molecular de 30 kDa de 500 µl, (Viva Spin) anteriormente lavada com 1 ml de tampão filtração em gel. A proteína foi concentrada até OD_{280} = 7,6 no que uma alíquota de 50 µl foi removida. O resto foi ainda concentrado até que a OD_{280} = 16,6. A cristalização pela difusão de vapor de gota pendurada foi realizada a 20°C usando bandejas Nextal e gotas de 2 µl + 2 µl nas duas concentrações de

proteína.

Os cristais de qualidade de difração cresceram depois de duas a três semanas a partir das gotas penduradas de concentração alta contendo 90,9 mM de tampão de PCTP pH 4,0, 9,1 mM de Tampão de PCTP pH 9,5 (1), 100 mM de sulfato de amônio, 14% p/v de PEG3350. Os cristais foram colhidos, crio-protegidos usando (-)(-) butano2,3diol (20% v/v na solução de reservatório correspondente) e subitamente congelados em um Oxford Cryostream a 100 K. Os cristais foram triados quanto a qualidade de difração usando um gerador de ânodo de rotação Rigaku FRe equipado com um detetor de CCD Saturn 944 e ponta Xstream cryo. Estes cristais que mostraram difração ordenada foram armazenados prontamente na coleção de dados em ID-29 na ESRF.

Os dados de difração foram coletados a partir de cristais únicos esfriados a 100 K na European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), linha de feixe ID29, utilizando um detetor ADSC Quantum Q315r. Dois conjuntos de dados foram registrados no comprimento de onda de 0,9787 Å em uma faixa angular de 225° e 155° em matrizes de rotação de 0,75° e 0,2°, respectivamente. Os dados de imagem de cada conjunto de dados foram integrados com MOSFLM (Leslie, 1991) e intercalados e graduados individualmente com programas do conjunto CCP4 (CCP4, 1994). As imagens com um $R_{intercalação}$ interno >20% por lote foram excluídos da graduação final. As estatísticas de coleta de dados são mostradas na Tabela 23.

Todos os cristais pertencem ao grupo espacial monoclínico $P2_1$ com dimensões de célula típicas de a = 98,5 Å, b = 66,7 Å e c = 203,8 Å com p = 91,7°. A unidade assimétrica cristalográfica contêm quatro moléculas de Fab e duas moléculas de IL-17A que resultam em um coeficiente de Matthews de 2,68 Å3/Da (Matthews, 1968) que corresponde a um teor de solvente de 54%. A estrutura complexa de IL-17A/Fab foi determinada pelo

método da substituição molecular usando o programa MOLREP da CCP4 (CCP4, 1994). Em um primeiro teste, 3 moléculas do domínio variável (resíduos 2 a 110 da cadeia leve e resíduos 2 a 124 da cadeia pesada) de Fab (gerado a partir de PDB entrada 1AQK, Faber *et al.*, 1998) podem ser posicionadas e orientadas. Subseqüentemente, as posições destes domínios variáveis de Fab foram fixadas e 3 moléculas do domínio constante de Fab (resíduos 111 a 216 da cadeia leve e resíduos 125 a 226 da cadeia pesada) foram posicionados e orientados. As moléculas Fab corretamente geradas indicaram uma solução de Substituição Molecular correta e permitiram a colocação da quarta e última molécula Fab na unidade assimétrica do retículo cristalino. O refinamento de probabilidade máxima restringida usando fatores B isotrópicos usando REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997) resultou em um $R_{trabalho}/R_{livre}$ inicial de 33,6%/41,5%. A reconstrução manual para o modelo Fab e recolocação da seqüência de aminoácido correta foram realizados usando o programa de gráficos moleculares COOT (Emsley & Cowtan, 2004). As moléculas de IL-17A foram identificadas pela inspeção visual do mapa de densidade de elétron FoFc residual. Pela colocação manualmente filamentos de vários comprimentos na densidade de elétron 2FoFc não ocupada, o motivo de aminoácido conservado de IL-17A [50-RSTSPW-57] foi reconhecido e pôde ser modelado de modo não ambíguo. Isto permitiu a sobreposição do modelo de IL-17F (PDB entrada 1JPY, Hymowitz *et al.*, 2001) que permitiu a interpretação rápida da molécula dimérica. A sobreposição também esclareceu que a parte da molécula que interagiu com Fab e foi bem ordenada, enquanto que a extremidade oposta da molécula dimérica alongada não foi visível na densidade de elétron, isto é, foi perturbada. O modelo de IL-17A foi construído tanto quanto a densidade de elétron permitiu. Depois de uma rodada de refinamento de probabilidade máxima restringida usando REFMAC com $R_{trabalho}/R_{livre}$ de 27,2%/33,4% de reconstrução manual e recolocação da seqüência de aminoácido correta foram

aplicados ao homodímero de IL-17A. Em uma última rodada de MR usando MOLREP, a reconstrução de homodímero de IL-17A (resíduos visíveis na densidade de elétron são de 39 a 129 da cadeia A e 44 a 132 da cadeia B) foi usada para orientar e localizar o segundo homodímero de IL-17A. A estrutura do complexo IL-17A Fab - contendo 4 moléculas Fab e 2 moléculas IL-17A - foi refinada até a convergência usando REFMAC antes que moléculas de água e íons sulfato tenham sido manualmente adicionados usando COOT. Os fatores R finais, $R_{trabalho}$ e R_{livre} são 22,7% e 28,4%, respectivamente.

Tabela 23. Parâmetros Cristalinos e Estatísticas de Processamento e Refinamento de Dados de Raios X

Grupo espacial	$P2_1$
Comprimento de onda (Å)	0,9787
Constantes de célula a (Å)	98,5
b (Å)	66,7
c (Å)	203,8
β (°)	91,7
Faixa de Resolução (Å)	102,1 - 2,63
Parte externa mais alta de resolução (Å)	2,77 - 2,63
Integralidade global (%)	100,0
Parte externa mais alta de integralidade (%)	100,0
Reflexões, únicas	79235
Multiplicidade	7,0
Parte externa mais alta de multiplicidade	6,9
$R_{intercalação}$ global (%) [1]	12,8
Parte externa mais alta de $R_{intercalação}$ (%)	46,0
R_{valor} global (%) [2]	22,7
R_{valor} livre (%)	28,4

[1] $R_{intercalação} = \Sigma_{hkl} [(\Sigma_i | I_1 - \langle I \rangle |) / (\Sigma_i I_i]$

[2] $R_{valor} = \Sigma_{hkl} | | F_{obs} | - | F_{calc} | | / \Sigma_{hkl} | F_{obs} |$

R_{livre} é o fator R de validação cruzada computado para o conjunto de teste de 5% de reflexões únicas

Seqüências

As seqüências do domínio VH, domínio VL e CDR de membros de ligação são mostradas na listagem de seqüência anexa, em que as SEQ ID NOS correspondem como segue:

PTN = seqüência de aminoácido

1	Anticorpo 01 VH DNA	32	Anticorpo 04 VH PTN
2	Anticorpo 01 VH PTN	33	Anticorpo 04 VH CDR1 PTN
3	Anticorpo 01 VH CDR1 PTN	34	Anticorpo 04 VH CDR2 PTN
4	Anticorpo 01 VH CDR2 PTN	35	Anticorpo 04 VH CDR3 PTN
5	Anticorpo 01 VH CDR3 PTN	36	Anticorpo 04 VL DNA
6	Anticorpo 01 VL DNA	37	Anticorpo 04 VL PTN
7	Anticorpo 01 VL PTN	38	Anticorpo 04 VL CDR1 PTN
8	Anticorpo 01 VL CDR1 PTN	39	Anticorpo 04 VL CDR2 PTN
9	Anticorpo 01 VL CDR2 PTN	40	Anticorpo 04 VL CDR3 PTN
10	Anticorpo 01 VL CDR3 PTN	41	Anticorpo 05 VH DNA
11	Anticorpo 02 VH DNA	42	Anticorpo 05 VH PTN
12	Anticorpo 02 VH PTN	43	Anticorpo 05 VH CDR1 PTN
13	Anticorpo 02 VH CDR1 PTN	44	Anticorpo 05 VH CDR2 PTN
14	Anticorpo 02 VH CDR2 PTN	45	Anticorpo 05 VH CDR3 PTN
15	Anticorpo 02 VH CDR3 PTN	46	Anticorpo 05 VL DNA
16	Anticorpo 02 VL DNA	47	Anticorpo 05 VL PTN
17	Anticorpo 02 VL PTN	48	Anticorpo 05 VL CDR1 PTN
18	Anticorpo 02 VL CDR1 PTN	49	Anticorpo 05 VL CDR2 PTN
19	Anticorpo 02 VL CDR2 PTN	50	Anticorpo 05 VL CDR3 PTN
20	Anticorpo 02 VL CDR3 PTN	51	Anticorpo 06 VH DNA
21	Anticorpo 03 VH DNA	52	Anticorpo 06 VH PTN
22	Anticorpo 03 VH PTN	53	Anticorpo 06 VH CDR1 PTN
23	Anticorpo 03 VH CDR1 PTN	54	Anticorpo 06 VH CDR2 PTN
24	Anticorpo 03 VH CDR2 PTN	55	Anticorpo 06 VH CDR3 PTN
25	Anticorpo 03 VH CDR3 PTN	56	Anticorpo 06 VL DNA
26	Anticorpo 03 VL DNA	57	Anticorpo 06 VL PTN
27	Anticorpo 03 VL PTN	58	Anticorpo 06 VL CDR1 PTN
28	Anticorpo 03 VL CDR1 PTN	59	Anticorpo 06 VL CDR2 PTN
29	Anticorpo 03 VL CDR2 PTN	60	Anticorpo 06 VL CDR3 PTN
30	Anticorpo 03 VL CDR3 PTN	61	Anticorpo 07 VH DNA
31	Anticorpo 04 VH DNA	62	Anticorpo 07 VH PTN
63	Anticorpo 07 VH CDR1 PTN	103	Anticorpo 11 VH CDR1 PTN
64	Anticorpo 07 VH CDR2 PTN	104	Anticorpo 11 VH CDR2 PTN
65	Anticorpo 07 VH CDR3 PTN	105	Anticorpo 11 VH CDR3 PTN
66	Anticorpo 07 VL DNA	106	Anticorpo 11 VL DNA
67	Anticorpo 07 VL PTN	107	Anticorpo 11 VL PTN
68	Anticorpo 07 VL CDR1 PTN	108	Anticorpo 11 VL CDR1 PTN
69	Anticorpo 07 VL CDR2 PTN	109	Anticorpo 11 VL CDR2 PTN
70	Anticorpo 07 VL CDR3 PTN	110	Anticorpo 11 VL CDR3 PTN
71	Anticorpo 08 VH DNA	111	Anticorpo 12 VH DNA
72	Anticorpo 08 VH PTN	112	Anticorpo 12 VH PTN
73	Anticorpo 08 VH CDR1 PTN	113	Anticorpo 12 VH CDR1 PTN
74	Anticorpo 08 VH CDR2 PTN	114	Anticorpo 12 VH CDR2 PTN
75	Anticorpo 08 VH CDR3 PTN	115	Anticorpo 12 VH CDR3 PTN
76	Anticorpo 08 VL DNA	116	Anticorpo 12 VL DNA
77	Anticorpo 08 VL PTN	117	Anticorpo 12 VL PTN
78	Anticorpo 08 VL CDR1 PTN	118	Anticorpo 12 VL CDR1 PTN

79 Anticorpo 08 VL CDR2 PTN
80 Anticorpo 08 VL CDR3 PTN
81 Anticorpo 09 VH DNA
82 Anticorpo 09 VH PTN
83 Anticorpo 09 VH CDR1 PTN
84 Anticorpo 09 VH CDR2 PTN
85 Anticorpo 09 VH CDR3 PTN
86 Anticorpo 09 VL DNA
87 Anticorpo 09 VL PTN
88 Anticorpo 09 VL CDR1 PTN
89 Anticorpo 09 VL CDR2 PTN
90 Anticorpo 09 VL CDR3 PTN
91 Anticorpo 10 VH DNA
92 Anticorpo 10 VH PTN
93 Anticorpo 10 VH CDR1 PTN
94 Anticorpo 10 VH CDR2 PTN
95 Anticorpo 10 VH CDR3 PTN
96 Anticorpo 10 VL DNA
97 Anticorpo 10 VL PTN
98 Anticorpo 10 VL CDR1 PTN
99 Anticorpo 10 VL CDR2 PTN
100 Anticorpo 10 VL CDR3 PTN
101 Anticorpo 11 VH DNA
102 Anticorpo 11 VH PTN
143 Anticorpo 15 VH CDR1 PTN
144 Anticorpo 15 VH CDR2 PTN
145 Anticorpo 15 VH CDR3 PTN
146 Anticorpo 15 VL DNA
147 Anticorpo 15 VL PTN
148 Anticorpo 15 VL CDR1 PTN
149 Anticorpo 15 VL CDR2 PTN
150 Anticorpo 15 VL CDR3 PTN
151 Anticorpo 16 VH DNA
152 Anticorpo 16 VH PTN
153 Anticorpo 16 VH CDR1 PTN
154 Anticorpo 16 VH CDR2 PTN
155 Anticorpo 16 VH CDR3 PTN
156 Anticorpo 16 VL DNA
157 Anticorpo 16 VL PTN
158 Anticorpo 16 VL CDR1 PTN
159 Anticorpo 16 VL CDR2 PTN
160 Anticorpo 16 VL CDR3 PTN
161 Cinomolgo IL-17 DNA
162 Cinomolgo IL-17 PTN
163 Anticorpo 1 VL DNA
164 Anticorpo 1 VL PTN
165 Anticorpo 2 VL DNA
166 Anticorpo 2 VL PTN
167 Anticorpos 3 e 9 VL DNA
168 Anticorpo 3 e 9 VL PTN
169 Anticorpo 4 VL DNA
170 Anticorpo 4 VL PTN
171 Anticorpo 5 e 8 VL DNA
172 Anticorpo 5 e 8 VL PTN

119 Anticorpo 12 VL CDR2 PTN
120 Anticorpo 12 VL CDR3 PTN
121 Anticorpo 13 VH DNA
122 Anticorpo 13 VH PTN
123 Anticorpo 13 VH CDR1 PTN
124 Anticorpo 13 VH CDR2 PTN
125 Anticorpo 13 VH CDR3 PTN
126 Anticorpo 13 VL DNA
127 Anticorpo 13 VL PTN
128 Anticorpo 13 VL CDR1 PTN
129 Anticorpo 13 VL CDR2 PTN
130 Anticorpo 13 VL CDR3 PTN
131 Anticorpo 14 VH DNA
132 Anticorpo 14 VH PTN
133 Anticorpo 14 VH CDR1 PTN
134 Anticorpo 14 VH CDR2 PTN
135 Anticorpo 14 VH CDR3 PTN
136 Anticorpo 14 VL DNA
137 Anticorpo 14 VL PTN
138 Anticorpo 14 VL CDR1 PTN
139 Anticorpo 14 VL CDR2 PTN
140 Anticorpo 14 VL CDR3 PTN
141 Anticorpo 15 VH DNA
142 Anticorpo 15 VH PTN
173 Anticorpo 6 VL DNA
174 Anticorpo 6 VL PTN
175 Anticorpo 7 VL DNA
176 Anticorpo 7 VL PTN
177 Anticorpo 10 VL DNA
178 Anticorpo 10 VL PTN
179 Anticorpo 11 VL DNA
180 Anticorpo 11 VL PTN
181 Anticorpos 12 e 16 VL DNA
182 Anticorpos 12 e 16 VL PTN
183 Anticorpo 13 VL DNA
184 Anticorpo 13 VL PTN
185 Anticorpo 14 VL DNA
186 Anticorpo 14 VL PTN
187 Anticorpo 15 VL DNA
188 Anticorpo 15 VL PTN
189 VH FR1 PTN
190 VH FR2 PTN
191 VH FR3 PTN
192 VH FR4 PTN
193 VL FR1 PTN
194 VL FR2 PTN
195 VL FR3 PTN
196 VL FR4 PTN
197 hIL-17A madura Identificada
198 IL-17A humana madura
199 peptídeo de IL-17A humana
200 hIL-17A precursora mutante Identificada
201 IL-17A humana madura mutante

Os Anticorpos 3, 4 e 5 têm o mesmo domínio VH.

Os Anticorpos 9, 10 e 12 têm o mesmo domínio VH.

Os Anticorpos 2 e 10 têm as mesmas CDRs VL. A seqüência

do domínio VL mostrada para o Anticorpo 2 é da linha germinativa e a seqüência do domínio VL mostrada para o Anticorpo 10 não é da linha germinativa.

Os Anticorpos 3, 9 e 11 têm o mesmo domínio VL.

Os Anticorpos 4 e 15 têm o mesmo domínio VL.

Os Anticorpos 5 e 8 têm o mesmo domínio VL.

Os Anticorpos 12 e 16 têm o mesmo domínio VL.

A seqüência de nucleotídeos do domínio VL dos anticorpos 1 a 16 não incluem o códon gag mostrado na extremidade 3' nas SEQ ID NOS: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 146 e 156. Correspondentemente, as seqüências de aminoácido do domínio VL não incluem o resíduo Glu de terminal C (resíduo 112) nas SEQ ID NOS: 7, 17, 27, 37, 47, 57, 67, 77, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147 e 157, respectivamente. O resíduo Glu112 e o códon gag correspondente não foram expressados nos Anticorpos de 1 a 16. Uma comparação das seqüências escritas com segmentos de gene da linha germinativa indica que o resíduo Glu e o códon gag correspondente não formam parte do domínio VL.

O resíduo Gly na posição 111 (o resíduo Kabat 108) foi presente nas seqüências scFv e IgG expressadas. Entretanto, este resíduo não está presente nas seqüências do segmento j da linha germinativa humana que formam a região de matriz 4 do domínio VL. O resíduo Gly não é considerado uma parte do domínio VL.

Para expressar a cadeia leve da IgG, uma seqüência de nucleotídeo que codifica a cadeia leve de anticorpo foi fornecida, que compreende um primeiro exon que codifica o domínio VL, um segundo exon que codifica o domínio CL e um intron separando o primeiro exon e o segundo exon. Sob circunstâncias normais, o intron é unido pelo mecanismos de processamento de mRNA celular, unindo a extremidade 3' do primeiro exon à extremidade 5' do segundo exon. Assim, quando o DNA tendo a dita

seqüência de nucleotídeo foi expressado como RNA, o primeiro e segundo exons foram unidos entre si. A tradução do RNA unido produz um polipeptídeo que compreende os domínios VL e CL. Depois da junção, o Gly na posição 111 é codificado pela última base (g) da seqüência da matriz 4 do domínio VL e as primeiras duas bases (gt) do domínio CL.

As seqüências do domínio VL dos Anticorpos de 1 a 16 são as SEQ ID NOS: 163 a 188 como indicadas acima. A extremidades das seqüências de nucleotídeo do domínio VL com cta como o códon final e Leu é o resíduo de aminoácido final nas seqüências de aminoácido do domínio VL correspondente.

Referências

Todas as referências citadas em qualquer lugar neste relatório descritivo, incluindo aquelas citadas em qualquer lugar acima, são aqui incorporadas por referência em sua totalidade para todos os propósitos.

Al - Lazikani *et al.* Journal Molecular Biology 273(4): 927 - 948, 1997

Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 405 - 410 Amit *et al.*, Science, 233: 747 - 753, 1986

Andersen, DC. & Krummen, L. Current Opinion in Biotechnology 13: 117, 2002

Antonysamy, MA. *et al.* J Immunol. 162(1): 577 - 84, 1999

Ausubel *et al.* eds., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 4ª edição 1999

Bagshawe, K. D. *et al.* Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915 - 922, 1991

Bannister, D *et al* Biotechnol bioeng 94(5): 931 - 937, 2006

Barbas *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 3809 - 3813, 1994

Betteli, E. *et al.* Nature 441 (7090), 166 - 168, (2006)

Bird *et al.* Science, 242, 423 - 426, 1988

Burchill, M A. *et al.* Infect Immun. 71(6): 3437 - 42, 2003

Bush, K. *et al.* Arthritis Rheum. 46: 802 - 805,2002 Cai, L. *et al.* Cytokine 16(1) 10 - 21, 2001

Caton *et al.* J. Immunol., 144: 1965 - 1968, 1990

CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4) (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallogr D 50: 760 - 763

Chabaud, M. *et al.* J. Immunol. 161, 409 - 414, 1998

Chabaud, M. *et al.* Arthritis Rheum. 42, 963 - 970, 1999

Chabaud, M. e Miossec, P. Arthritis Rheum. 44(6) 1293 - 1303, 2001

Chadd, H E. e Chamow, S M. Current Opinion in Biotechnology 12: 188 - 194, 2001

Cho, M L. *et al.* Arthritis Rheum. 50(3), 776 - 784, 2004

Chothia *et al.* Science, 223: 755 - 758, 1986

Chothia *et al.* J. Mol. Biol., 196: 901 - 917, 1987

Chothia *et al.* Nature, 342: 877 - 883, 1989

Chothia, C. *et al.* Journal Molecular Biology 1992227, 799 - 817, 1992

Chung, DR. *et al.* J Exp Med. 195(11): 1471 - 8, 2002

Clackson, T. e Lowman, H. B. Phage Display - A Practical Approach, 2004. Oxford University Press

Csiszar, A. FASEB J.;17(9): 1183 - 5, 2003

Csiszar, A. e Ungvari, Z. Med Hypotheses, 63(4): 696 - 8, 2004

Denison DGT. (Editor), Holmes, CC. *et al.* Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (Julho de 2002), ISBN: 0471490369

Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) Coot: model - building tools for molecular graphics Acta Crystallogr D60: 2126 - 2132

Englander, S. W. *et al.* Methods Enzymol. 232: 26 - 42, 1994

Faber *et al.*, Immunotechnology 3, 253 - 270, 1998

Faour, W H. *et al.* J.Biol. Chem. 278(29): 26897 - 26907, 2003

Ferretti, S. *et al.* J. Immunol. 170: 2106 - 2112, 2003

Fisman, E Z. Cardiovasc Diabetol. 12: 2: 11, 2003

Foote & Winter J Mol Biol. 20 de março de 1992; 224(2): 487 - 99

Fort, M. *et al.* Immunity, 15: 985 - 995, 2001

Fujino, S. *et al.* Gut 52: 65 - 70, 2003

Ghose, A K. & Viswanadhan, V N. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery. ISBN: 0 - 8247 - 0487 - 8

Glennie, M J. *et al.*, 1987 J. Immunol. 139, 2367 - 2375

Gram *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89: 3576 - 3580

Guex, N. e Peitsch, M. C. Electrophoresis (1997) 18, 2714 - 2723

Haan & Maggos (2004) BioCentury, 12(5): A1 - A6

Hamzaoui, K. *et al.* Scand J Rheumatol. 31(4): 205 - 10, 2002

Harlow e Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N. Y., pp. 726, 1988

Haudenschild, D. *et al.* J Biol Chem., 277: 4309 - 16, 2002

Haudenschild, D. *et al.* Prostate, antes da publicação, 2006

Haznedaroglu, S. *et al.* Clin Exp Rheumatol. 23(4 Supl 38): S77 - 80, 2005

Hellings, P W. *et al.* Am J Respir Cell Mol Biol. 28(1): 42 - 50, 2003

Holliger, P. *et al*, PNAS USA 90: 6444 - 6448, 1993a

Holliger, P. & Winter, G. 1999 Cancer and metastasis rev. 18: 411 - 419, 1999

Holt *et al.* Trends in Biotechnology 21, 484 - 490, 2003

Honorati, M C. *et al.* Osteoarthritis & Cartilage 10: 799 - 807, 2002

Hsieh, H G. *et al.* Transpl. Int. 14: 287 - 298, 2001

Hu, S. *et al*, Cancer Res., 56, 3055 - 3061, 1996

Hunter W M. e Greenwood F C. Nature, 194: 495, 1962

Hurst, S D. *et al.* J Immunol, 169: 443 - 453, 2002

Huston. PNAS USA, 85, 5879 - 5883, 1988

Hutchings, C. Generation of Naive Human Antibody Libraries, in Antibody Engineering, R. Kontermann e S. Dubel, Editores. 2001, Springer Laboratory Manuals, Berlim. p. 93

Hymowitz, S G. *et al.* EMBO J, 50: 53321 - 5341, 2001

Kabat, E A. *et al.* Seqüences of Proteins of Immunological Interest. 4ª Edição. US Department of Health and Human Services, 1987 Kabat, EA. I. (1991a) Seqüences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Edição. US Department of Health and Human Services,

Public Service, NIH, Washington

Kabat *et al.*, J. Immunol., 147: 1709 - 1719, 1991 (b)

Kandel, Abraham & Backer, Eric. Computer - Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (11 de maio de 1995), ISBN: 0133418847

Karpusas *et al.*, Structure 9, 321, 2001

Katz, Y. *et al.* Arthritis Rheum. 44(9): 2176 - 2184, 2001

Kay, B K., Winter, J., e McCafferty, J. Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press, 1996

Knappik *et al.* J. Mol. Biol. 296, 57 - 86, 2000

Koenders, M I. *et al.* Am J Pathol. 167(1): 141 - 9, 2005 (a)

Koenders, M I. *et al.* Arthritis Rheum. 52(3): 975 - 983, 2005 (b)

Kohler e Milstein, Nature, 256: 495 - 497, 1975

Koide *et al.* Journal of Molecular Biology, 284: 1141 - 1151, 1998

Kontermann, R & Dubel, S, Antibody Engineering, Springer - Verlag Nova Iorque, LLC; 2001, ISBN: 3540413545.

Kotake, S. *et al.* J.Clin. Invest. 103: 1345 - 1352, 1999

Kramer, G. e Marberger, M. Curr Opin Urol. Jan; 16(1): 25 - 9, 2006

Krebs *et al.* Journal of Immunological Methods, 254: 67 - 84, 2001

Krzanowski, W. Principles of Multivariate Analysis: A User's

Perspective (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (Dezembro de 2000), ISBN: 0198507089

Kuestner R. *et al.* Abstract 206, Keystone Symposia 'Cytokine, Disease and Therapeutic Intervention', 2005

Kurasawa, K. *et al.* Arthritis Rheum, 43(11): 2455 - 63, 2000

Larrick, J W. e Thomas, D W. Current Opinion in Biotechnology 12: 411 - 418, 2001

Le Grand, A. *et al.* Arthritis Rheum. 44(9): 2078 - 2083, 2001

Ledermann J A. *et al.* Int. J. Cancer 47: 659 - 664, 1991

Lee, J. *et al.* J Biol Chem. 2769: 1660 - 1664, 2001

Leslie A. (1991) Macromolecular data processing. Em Moras, D., Podjarny, A. D. e Thierry, J. C. (eds), Crystallographic Computing V. Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 27 - 38

Li, H. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 773 - 778, 2000

Linden, A. Pulm Pharmacol Ther., 19(1): 47 - 50, 2006

Lock, C. *et al.* Nat. Med. 8: 500 - 508, 2002

Lubberts, E. *et al.* Arthritis Rheum. 43: 1300 - 1306, 2000

Lubberts, E. *et al.* J. Immunol. 167(2): 1004 - 1013, 2001

Lubberts, E. *et al.* J Immunol. 170(5): 2655 - 6, 2003

Lubberts, E. *et al.* Arthritis Rheum. 50(2): 650 - 659, 2004

Mach *et al* Anal. Biochem. 200(1): 20 - 26, 1992

Maertzdorf, J. *et al.* J Immunol, 169(10): 5897 - 903, 2002

Maggio, E. *et al.* Ann Oncol., 13 Supl 1: 52 - 6, 2002

Malemud, C J. *et al.* Biodrugs 18(1): 23 - 35, 2004

Marks *et al.* Bio/Technology, 10: 779 - 783, 1992

Matthews, J. Mol. Biol 33, 491 - 497 (1968)

McCafferty *et al.* Nature, 348: 552 - 554, 1990

Mendez, M. *et al.* Nature Genet, 15(2): 146 - 156, 1997

Merchand *et al.* Nature Biotech., 16: 677 - 681, 1998

Molet, S. M. *et al.* J. Allergy Clin. Immunol. 108: 430 - 438, 2001

Moore, E E. *et al.* Neuromusc Disord., 12: 141 - 150, 2002

Moseley, T A. *et al.* Cyto Growth Factor Rev., 14: 155 - 174, 2003

Murshudov, G. N., Vagin, A. A., e Dodson, E. J. (1997) Acta Crystallogr D53: 240 - 255

Nakae, S. *et al.* J. Immunol. 171(11): 6173 - 6177, 2003

Nielsen, O H. *et al.* Scand J Gastroenterol, 38(2): 180 - 5, 2003

Norman *et al.* Applied Regression Analysis. Wiley - Interscience; 3ª edição (Abril de 1998) ISBN: 0471170828

Numasaki, M. *et al.* J Immunol., 175(9): 6177 - 89, 2005

Nygren *et al.* Current Opinion in Structural Biology, 7: 463 - 469, 1997

Oda, N. *et al.* Am J Respir Crit Care Med., 171(1): 12 - 8, 2005

Osbourn, J K. *et al.* Immunotechnology, 2(3): 181 - 96, 1996

Padavattan *et al.*, J. Mol. Biol 368, 742, 2007

Pantazatos, D. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. 101(3): 751 - 756, 2004

Pearson e Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444 - 2448

Persic, L. *et al.* Gene. 187(1): 9 - 18, 1997

Pliickthun, A. Bio/Technology 9: 545 - 551, 1991

Reiter, Y. *et al*, Nature Biotech, 14: 1239 - 1245, 1996

Repp, R. *et al.*, J. Hemat. 377 - 382, 1995

Ridgeway, J B B. *et al*, Protein Eng., 9: 616 - 621, 1996

Robinson, J R. ed., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978

Ruddy, M J. *et al.* J.Biol. Chem 279(4): 2559 - 2567, 2004

Rudolf, R. *et al.* FASEB J. 10, 49 - 56, 1996

Sambrook e Russell, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3ª edição, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Schier *et al.*, J. Mol. Biol. 263: 551 - 567, 1996

Segal *et al.* PNAS, 71: 4298 - 4302, 1974

Sharon *et al.* PNAS, 87: 4814 - 4817, 1990 (a)

Sharon *et al.* J. Immunol., 144: 4863 - 4869, 1990 (b)

Shen, F. *et al.* Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 27(10): 654 - 8 2004(a)

Shen, F. *et al.* Zhonghua Nei Ke Za Zhi, 43(12): 888 - 90, 2004 (b)

Shi, Y. *et al.* J. Biol Chem, 275: 19167 - 19176, 2000

Smith e Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195 - 197

Sohn, M H. *et al.* Scand J Rheumatol. 32(6)346 - 6, 2003

Staerz U. D. e Bevan M. J. PNAS 83, 1986

Stamp, L. K. *et al.* J. Rheumatol. 31(7): 1246 - 1254, 2004

Starnes, T. *et al.* J. Immunol, 169: 642 - 646, 2002

Stemmer, Nature, 370: 389 - 391, 1994

Suresh M R. *et al.*, Method Enzymol. 121: 210 - 228, 1986

Sylvester, J. *et al.* Cell Signal 16(4): 469 - 476, 2004

Takahashi, K. J Olin Periodontol. 32(4): 369 - 74, 2005

Tang, J L. *et al.* Transplantation, 72(2): 348 - 50, 2001

Teunissen, M. B. M. *et al.* J. Invest. Dermatol. 111: 645 - 649, 1998

Thompson, J. *et al.* J Mol Biol. 256(1): 77 - 88, 1996

Toda, M. *et al.* J Allergy Clin Immunol. 111(4): 875 - 81, 2003

Tomlinson, I., VBASE. MRC Centre of Protein Engineering, Cambridge, UK, 1997

Touil, T. *et al.* Drug News Perspect., 19(2): 77 - 83, 2006

Toy, D., *et al* Journal of Immunology., 177(1): 36 - 39, 2006

Vanaudenaerde, B M. *et al.* J Heart Lung Transplant. 22(11): 1280 - 3, 2003

Van Bezooijen, R L. *et al.* J Bone Miner Res. 14(9): 1513 - 21, 1999

Vaughan, T J. *et al.* Nature Biotechnology 14(3): 309 - 14, 1996

Vernal, R. *et al.* J Clin Periodontol. 32(4): 383 - 9, 2005

Voet & Voet, Biochemistry, 2ª Edição, (Wiley) 1995

Ward, E S. *et al.*, Nature 341: 544 - 546, 1989

Wess, L. Em: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1 - A7, 2004

Whitelegg, N R U. e Rees, A R. Prot. Eng., 12: 815 - 824, 2000

Witten, Ian H. & Frank, Eibe. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (11 de Outubro de 1999), ISBN: 1558605525

Wold, *et al.* Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics - Mathematics and Statistics in Chemistry (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holanda, 1984 (ISBN 90 - 277 - 1846 - 6)

Wong, C K. *et al.* Lupus, 9(8): 589 - 93, 2000

Wong, C K. *et al.* Clin Exp Immunol. 125(2): 177 - 83, 2001

Yen, D. *et al.* J Clin Invest. 116(5): 1310 - 6, 2006

Yoshida, S. *et al.* Am J Transplant. 6(4): 724 - 35, 2006

Zhang, Z. *et al.* Inflamm Bowel Die. 12(5): 382 - 8, 2006

REIVINDICAÇÕES

1. Membro de ligação isolado para IL-17A humana, caracterizado pelo fato de que o membro de ligação liga pelo menos um resíduo de Cys-Arg-His-Leu-Gly-Cys-Ile-Asn-Ala-Asp-Gly-Asn-Val-Asp-Tyr-His-Met (SEQ ID NO: 199) nas posições de 71-87 da IL-17A humana madura.

2. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o membro de ligação liga a IL-17A humana madura nos resíduos Leu74, Tyr85, His86 e/ou Met87.

3. Membro de ligação de acordo com as reivindicações 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que tem uma afinidade para ligar a IL-17A humana madura tendo a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 198 que é mais do que 10 vezes maior do que para ligar a IL-17A humana mutante tendo a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 201, em que a afinidade é Kd calculada a partir da razão de constantes de taxa kd1/ka1 como determinadas pela ressonância de plasma de superfície usando um modelo de dados de analito bivalente.

4. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o membro de ligação não liga IL-17A humana mutante tendo a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 201.

5. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a ligação do membro de ligação à IL-17A humana não é inibida em mais do que 50% por 1 μM de qualquer um de IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E ou IL-17F em um ensaio de competição de epítopo usando IL-17A rotulada a um concentração igual à Kd da interação do membro de ligação com IL-17A humana, em que a dita Kd é calculada a partir da razão de constantes de taxa kd1/ka1 como determinadas pela ressonância de plasma de superfície usando um modelo de dados de analito bivalente.

6. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das

reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o membro de ligação tem uma afinidade para a IL-17A de cinomolgo que é menor do que 5 vezes diferente da sua afinidade para IL-17A humana, em que a afinidade é Kd calculada a partir da razão de constantes de taxa kd1/ka1 como determinadas pela ressonância de plasma de superfície usando um modelo de dados de analito bivalente.

7. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a IC50 do membro de ligação em um ensaio de célula HT1080 de liberação de IL-6 em resposta a 1 nM de IL-17A humana difere em não mais do que 10 vezes de IC50 do membro de ligação em um ensaio de célula HT1080 de liberação de IL-6 em resposta a 1 nM de IL-17A de cinomolgo.

8. Membro de ligação isolado para IL-17A humana, caracterizado pelo fato de que compreende um conjunto de CDRs: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3, em que o conjunto de CDRs tem 10 ou menos substituições de aminoácido de um conjunto de CDRs, em que:

HCDR1 é a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 63;
HCDR2 é a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 64;
HCDR3 é a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 65;
LCDR1 é a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 68;
LCDR2 é a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 69; e
LCDR3 é a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 70.

9. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de que compreende um conjunto de CDRs: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3, em que o conjunto de CDRs tem 10 ou menos substituições de aminoácido de um conjunto de CDRs em que:

HCDR1 é a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 63;

HCDR2 é a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 64;

HCDR3 é a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 65;

LCDR1 é a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 68;

LCDR2 é a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 69; e

LCDR3 é a seqüência de aminoácido SEQ ID NO: 70.

10. Membro de ligação de acordo com as reivindicações 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que compreende zero, uma ou duas substituições no conjunto de CDRs.

11. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende uma HCDR1 em que o resíduo Kabat 31 é Ser, Ala, Gly, Thr ou Cys e o resíduo Kabat 32 é Tyr.

12. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende uma HCDR2 em que o resíduo Kabat 58 é Tyr ou Phe.

13. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende uma HCDR3 em que o resíduo Kabat 96 é um resíduo hidrofóbico, o resíduo Kabat 97 é um resíduo hidrofóbico e o resíduo Kabat 98 é um resíduo cíclico.

14. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o resíduo Kabat 96 é Leu, Ile, Val, Ala ou Phe.

15. Membro de ligação de acordo com as reivindicações 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que o resíduo Kabat 97 é Ile, Leu, Val, Ala ou Phe.

16. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 13 a 15, caracterizado pelo fato de que o resíduo Kabat 98 é His, Trp ou Phe.

17. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende uma

LCDR1 em que o resíduo Kabat 31 é Tyr ou Phe e o resíduo Kabat 32 é Tyr ou Phe.

18. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende uma LCDR3 em que o resíduo Kabat 91 é Tyr e o resíduo Kabat 93 é Pro, hidroxiprolina, His ou 3-metilistidina.

19. Membro de ligação isolado para IL-17A humana, caracterizado pelo fato de que compreende um conjunto de CDRs: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3, em que:

o resíduo Kabat 31 de HCDR1 é Ser, Ala, Gly, Thr ou Cys;

o resíduo Kabat 32 de HCDR1 é Tyr;

o resíduo Kabat 58 de HCDR2 é Tyr ou Phe;

o resíduo Kabat 96 de HCDR3 é um resíduo hidrofóbico;

o resíduo Kabat 97 de HCDR3 é um resíduo hidrofóbico;

o resíduo Kabat 98 de HCDR3 é um resíduo cíclico;

o resíduo Kabat 31 de LCDR1 é Tyr ou Phe;

o resíduo Kabat 32 de LCDR1 é Tyr ou Phe;

o resíduo Kabat 91 de LCDR3 é Tyr; e

o resíduo Kabat 93 de LCDR3 é Pro, hidroxiprolina, His ou 3-metilistidina.

20. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende uma HCDR3 em que o resíduo Kabat 98 é His.

21. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende uma LCDR3 em que o resíduo Kabat 93 é Pro.

22. Membro de ligação isolado de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende um conjunto de CDRs: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e

LCDR3, em que:

o resíduo Kabat 31 de HCDR1 é Ser;

o resíduo Kabat 32 de HCDR1 é Tyr;

o resíduo Kabat 58 de HCDR2 é Tyr;

o resíduo Kabat 96 de HCDR3 é Leu;

o resíduo Kabat 97 de HCDR3 é Ile;

o resíduo Kabat 98 de HCDR3 é His;

o resíduo Kabat 31 de LCDR1 é Tyr;

o resíduo Kabat 32 de LCDR1 é Tyr;

o resíduo Kabat 91 de LCDR3 é Tyr; e

o resíduo Kabat 93 de LCDR3 é Pro.

23. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 22, caracterizado pelo fato de que compreende uma seqüência HCDR3 em que HCDR3 é a SEQ ID NO: 65.

24. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 23, caracterizado pelo fato de que compreende uma seqüência de LCDR3 em que LCDR3 é a SEQ ID NO: 70.

25. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 8 a 24, caracterizado pelo fato de que

HCDR1 é a SEQ ID NO: 63;

HCDR2 é a SEQ ID NO: 64;

LCDR1 é a SEQ ID NO: 68; e

LCDR2 é a SEQ ID NO: 69.

26. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 10 a 22, caracterizado pelo fato de que

HCDR1 é a SEQ ID NO: 63;

HCDR2 é a SEQ ID NO: 64;

HCDR3 é a SEQ ID NO: 65;

LCDR1 é a SEQ ID NO: 68;

LCDR2 é a SEQ ID NO: 69; e

LCDR3 é a SEQ ID NO: 70.

27. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que compreende um conjunto de CDRs: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3 de qualquer um dos anticorpos de 1 a 16 como mostrado na Tabela 21.

28. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 25, caracterizado pelo fato de que o membro de ligação tem uma IC50 de não mais do que 1 nM como determinado em um ensaio de célula HT1080 de liberação de IL-6 em resposta a 1 nM da IL-17A humana.

29. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 25 ou reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o membro de ligação tem uma IC50 de não mais do que 0,5 nM como determinada em um ensaio de célula HT1080 de liberação sinergizada de IL-6 em resposta a 125 μM de IL-17A humana e 25 μM TNFα.

30. Membro de ligação isolado para IL-17A humana, caracterizado pelo fato de que o membro de ligação tem um Kd para IL-17A humana de menos do que 2,5 nM calculada a partir da razão de constantes de taxa kd1/ka1 como determinadas pela ressonância de plasma de superfície usando um modelo de dados de analito bivalente.

31. Membro de ligação isolado para IL-17A humana, caracterizado pelo fato de que o membro de ligação tem uma IC50 de não mais do que 1 nM como medida em um ensaio de célula HT1080 que mede a liberação de IL-6 em resposta a 1 nm de IL-17A humana e em que a dita IC50 difere em não mais do que 10 vezes da IC50 do membro de ligação como medida em um ensaio de célula HT1080 que mede a liberação de IL-6 em resposta a 1 nM de IL-17A de cinomolgo.

32. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5 e 8, caracterizado pelo fato de que compreende uma

seqüência de HCDR3 em que HCDR3 é a SEQ ID NO: 15.

33. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5 e 8, caracterizado pelo fato de que compreende uma seqüência de LCDR3 em que LCDR3 é a SEQ ID NO: 20.

34. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o membro de ligação compreende uma molécula de anticorpo que compreende um domínio VH de anticorpo e um domínio VL de anticorpo, em que a molécula de anticorpo compreende um conjunto de CDRs: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3, em que

o domínio VH compreende HCDR1, HCDR2 e HCDR3 e as regiões de matriz de cadeia pesada FR1, FR2, FR3 e FR4,

e o domínio VL compreende LCDR1, LCDR2 e LCDR3 e as regiões de matriz de cadeia leve FR1, FR2, FR3 e FR4.

35. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que:

o resíduo Kabat 28 na VH FR1 é Thr ou Ser;

o resíduo Kabat 30 na VH FR1 é Ser ou Thr; e/ou

o resíduo Kabat 49 na VL FR2 é Phe.

36. Membro de ligação de acordo com as reivindicações 34 ou 35, caracterizado pelo fato de que compreende uma região constante de anticorpo.

37. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que a molécula de anticorpo é uma IgG1.

38. Membro de ligação de acordo com as reivindicações 34 ou 35, caracterizado pelo fato de que a molécula de anticorpo é um scFv.

39. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 34 a 38, caracterizado pelo fato de que as regiões de matriz de cadeia pesada e/ou leve compreendem seqüências de segmento de gene da

linha germinativa humana.

40. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que a FR1 de cadeia pesada é a SEQ ID NO: 189, a FR2 é a SEQ ID NO: 190, a FR3 é a SEQ ID NO: 191 e a FR4 é a SEQ ID NO: 192.

41. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o domínio VH de anticorpo tem a seqüência de aminoácido do domínio VH mostrada na SEQ ID NO: 62.

42. Membro de ligação de acordo com qualquer uma das reivindicações de 39 a 41, caracterizado pelo fato de que a FR1 de cadeia leve é a SEQ ID NO: 193, a FR2 é a SEQ ID NO: 194, a FR3 é a SEQ ID NO: 195 e a FR4 é a SEQ ID NO: 196.

43. Membro de ligação de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que o domínio VL de anticorpo tem a seqüência de aminoácido do domínio VL mostrada na SEQ ID NO: 176.

44. Molécula de anticorpo isolada, caracterizada pelo fato de que compreende um domínio VH com a seqüência de aminoácido do domínio VH mostrada na SEQ ID NO: 62 e um domínio VL com a seqüência de aminoácido do domínio VL mostrada na SEQ ID NO: 176.

45. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 44, caracterizada pelo fato de que é uma IgG1.

46. Molécula de anticorpo de acordo com a reivindicação 44, caracterizada pelo fato de que é um scFv.

47. Domínio VH, caracterizado pelo fato de ser isolado de uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações de 34 a 44.

48. Domínio VL, caracterizado pelo fato de ser isolado de uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações de 34 a 44.

49. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um membro de ligação como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 43 ou uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações de 44 a 46 e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

50. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um membro de ligação como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 43 ou uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações de 44 a 46, para o uso em um método de tratamento do corpo humano ou animal pela cirurgia ou terapia.

51. Composição de acordo com a reivindicação 50, caracterizada pelo fato de que é para o uso no tratamento de um distúrbio associado com a IL-17A.

52. Uso de membro de ligação como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 43 ou uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações de 44 a 46, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para tratar um distúrbio associado com a IL-17A.

53. Método para tratar um distúrbio associado com a IL-17A em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende administrar um membro de ligação como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 43 ou uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações de 44 a 46 ao indivíduo.

54. Composição de acordo com a reivindicação 51, uso de acordo com a reivindicação 52 ou um método de acordo com a reivindicação 53, caracterizada pelo fato de que o distúrbio é um distúrbio inflamatório.

55. Composição de acordo com a reivindicação 51, uso de acordo com a reivindicação 52 ou um método de acordo com a reivindicação 53, caracterizada pelo fato de que o distúrbio é a artrite reumatóide, osteoartrite, perda óssea, hipersensibilidade das vias aéreas, um distúrbio

desmielinante, psoríase, hipersensibilidade dérmica, rejeição a transplante aguda, rejeição de aloenxerto, doença do hospedeiro versus enxerto, esclerose sistêmica, lupus eritematoso sistêmico, uma doença do intestino inflamatório autoimune, um distúrbio inflamatório urológico, uma doença cardiovascular, vasculite, uma febre periódica, um distúrbio do metabolismo de glicose, uma doença pulmonar, um câncer, peridontite, queratite estrômica hepática, uma alergia, artrite reativa, dor inflamatória, uma espondiloartropatia, septicemia, choque séptico ou choque endotóxico, meningite, trauma cirúrgico, um distúrbio hematológico autoimune, mal de Alzheimer, sarcoidose, cirrose, hepatite, glomerulonefrite ou dislipidemia.

56. Composição, uso ou método de acordo com a reivindicação 55, caracterizada pelo fato de que o distúrbio é a artrite reumatóide.

57. Molécula de ácido nucleico isolada, caracterizada pelo fato de que compreende uma seqüência de nucleotídeo que codifica:

um membro de ligação como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 43;

uma molécula de anticorpo como definida em qualquer uma das reivindicações de 44 a 46;

um domínio VH como definido na reivindicação 47; ou

um domínio VL como definido na reivindicação 48.

58. Célula hospedeira, caracterizada pelo fato de que é transformada *in vitro* com o ácido nucleico como definido na reivindicação 57.

59. Método para produzir um membro de ligação, molécula de anticorpo ou domínios VH ou VL isolados de uma molécula de anticorpo, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar células hospedeiras como definidas na reivindicação 58 sob condições para a produção do membro de ligação, molécula de anticorpo ou domínio VH ou VL de anticorpo.

60. Método de acordo com a reivindicação 59, caracterizado pelo fato de que compreende ainda isolar e/ou purificar o membro de ligação, molécula de anticorpo, domínio VH ou domínio VL.

61. Método para produzir uma composição compreendendo um membro de ligação, molécula de anticorpo ou domínios VH ou VL, caracterizado pelo fato de que compreende:

produzir um membro de ligação, molécula de anticorpo ou domínios VH ou VL pelo método como definido na reivindicação 59 ou reivindicação 60; e

formular o membro de ligação, molécula de anticorpo ou domínios VH ou VL em uma composição que compreenda pelo menos um componente adicional.

62. Método para produzir um domínio de ligação de antígeno de anticorpo para IL-17A humana, caracterizado pelo fato de que compreende

fornecer, por via de adição, deleção, substituição ou inserção de um ou mais aminoácidos na seqüência de aminoácido de um domínio VH precursor que compreende HCDR1, HCDR2 e HCDR3, em que o domínio VH precursor de HCDR1, HCDR2 e HCDR3 são um conjunto de HCDRs como mostrado na Tabela 21, um domínio VH que é uma variante de seqüência de aminoácido do domínio VH precursor e opcionalmente combinar o domínio VH assim fornecido com um ou mais domínios VL para fornecer uma ou mais combinações VH/VL; e

testar o dito domínio VH que é uma variante de seqüência de aminoácido do domínio VH precursor ou a combinação VH/VL ou combinações para identificar um domínio de ligação de antígeno de anticorpo para a IL-17A humana.

63. Método de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que o domínio VH precursor tem a seqüência de aminoácido do domínio VH mostrado na SEQ ID NO: 62.

64. Método de acordo com a reivindicação 62 ou reivindicação 63, caracterizado pelo fato de que os ditos um ou mais domínios VL são fornecidos por via de adição, deleção, substituição ou inserção de um ou mais aminoácidos na seqüência de aminoácido de um domínio VL precursor que compreende LCDR1, LCDR2 e LCDR3, em que o domínio VL precursor LCDR1, LCDR2 e LCDR3 são um conjunto de VL de CDRs como mostrado na Tabela 21, produzindo um ou mais domínios VL cada um dos quais é uma seqüência de aminoácido variante do domínio VL precursor.

65. Método de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que o domínio VL precursor tem a seqüência de aminoácido do domínio VL mostrada na SEQ ID NO: 176.

66. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 62 a 65, caracterizado pelo fato de que o dito domínio VH que é uma variante de seqüência de aminoácido do domínio VH precursor é fornecido pela mutagênese de CDR.

67. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 62 a 66, caracterizado pelo fato de que compreende ainda produzir o domínio de ligação de antígeno de anticorpo como um componente de uma molécula de anticorpo de IgG, scFv ou Fab.

68. Método para produzir um membro de ligação que se liga à IL-17A humana, caracterizado pelo fato de que compreende:

fornecer o ácido nucleico de partida que codifica um domínio VH ou um repertório de partida de ácidos nucleicos cada um dos quais codifica um domínio VH, em que o domínio VH ou domínios VH compreendem uma HCDR1, HCDR2 e/ou HCDR3 a ser substituída ou carecem de uma região que codifica HCDR1, HCDR2 e/ou HCDR3;

combinar o dito ácido nucleico de partida ou repertório de partida com o ácido nucleico doador ou ácidos nucleicos doadores codificadores ou produzidos pela mutação da seqüência de aminoácido de

uma HCDR1, HCDR2 e/ou HCDR3 mostrada na Tabela 21, tal que o dito ácido nucleico doador é ou os ácidos nucleicos doadores são inseridos nas regiões CDR1, CDR2 e/ou CDR3 no ácido nucleico de partida ou repertório de partida, de modo a fornecer um repertório de produto de ácidos nucleicos que codificam domínios VH;

expressar os ácidos nucleicos do dito repertório de produto para produzir domínios VH de produto;

opcionalmente combinar os ditos domínios VH de produto com um ou mais domínios VL;

selecionar um membro de ligação para IL-17A humana, membro de ligação este que compreende um domínio VH de produto e opcionalmente um domínio VL; e

recuperar o dito membro de ligação ou o ácido nucleico que o codifica.

69. Método de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que os ácidos nucleicos doadores são produzidos pela mutação da dita HCDR1 e/ou HCDR2.

70. Método de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico doador é produzido pela mutação de HCDR3.

71. Método de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que compreende fornecer o ácido nucleico doador pela mutação aleatória de ácido nucleico.

72. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 68 a 71, caracterizado pelo fato de que compreende ainda ligar um domínio VH de produto que está compreendido dentro do membro de ligação recuperado a uma região constante de anticorpo.

73. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 68 a 71, caracterizado pelo fato de que compreende fornecer uma molécula de

anticorpo IgG, scFv ou Fab que compreende o domínio VH de produto e um domínio VL.

74. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 62 a 73, caracterizado pelo fato de que compreende ainda testar o domínio de ligação de antígeno de anticorpo ou membro de ligação que se liga a IL-17A humana quanto a capacidade para neutralizar IL-17A humana.

75. Método de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que um membro de ligação que compreende uma molécula de anticorpo que se liga à IL-17A e a neutraliza é obtido.

76. Método de acordo com a reivindicação 75, caracterizado pelo fato de que a molécula de anticorpo é um scFv.

77. Método de acordo com a reivindicação 75, caracterizado pelo fato de que a molécula de anticorpo é uma IgG.

78. Método para produzir uma composição de molécula de anticorpo, caracterizado pelo fato de que compreende obter uma molécula de anticorpo usando um método como definido em qualquer uma das reivindicações de 62 a 77 e formular a molécula de anticorpo em uma composição que compreende pelo menos um componente adicional.

MGGLNDIFEAQKIEWHEIVKAGITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDY
YNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCP
NSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA

FIGURA 1

MTPGKTSLVSLLLLLSLEAIVKAGITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSS
DYYNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHQRCVNAEGKLDHHMNSVPIQQEILVLRREPPH
CPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVAHHHHH

FIGURA 2

RESUMO

"MEMBRO DE LIGAÇÃO ISOLADO PARA IL-17A HUMANA, MOLÉCULA DE ANTICORPO ISOLADA, DOMÍNIOS VH E VL, COMPOSIÇÃO, USO DE MEMBRO DE LIGAÇÃO, MÉTODO PARA TRATAR UM DISTÚRBIO, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO ISOLADA, CÉLULA HOSPEDEIRA, E, MÉTODOS PARA PRODUZIR UM MEMBRO DE LIGAÇÃO, MOLÉCULA DE ANTICORPO OU DOMÍNIOS VH OU VL, UMA COMPOSIÇÃO, E UM DOMÍNIO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DE ANTICORPO PARA IL-17A HUMANA"

Membros de ligação, especialmente moléculas de anticorpo, para a interleucina 17 (IL-17). Os membros de ligação são úteis para o tratamento de distúrbios associados com a interleucina 17 tais como a artrite reumatóide.