



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1014544-3 B1



(22) Data do Depósito: 05/05/2010

(45) Data de Concessão: 15/09/2020

(54) Título: ANTICORPO ANTI-IL-17F MONOCLONAL TOTALMENTE HUMANO ISOLADO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO O MESMO

(51) Int.Cl.: A61K 38/00; C07K 14/54; C07K 16/24.

(30) Prioridade Unionista: 05/05/2009 US 61/175,512.

(73) Titular(es): NOVIMMUNE S.A..

(72) Inventor(es): KRZYSZTOF MASTERNAK; FRANCOIS ROUSSEAU.

(86) Pedido PCT: PCT IB2010001436 de 05/05/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/128407 de 11/11/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 04/11/2011

(57) Resumo: ANTICORPOS ANTI-IL-17F E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS. A presente invenção refere-se a anticorpos monoclonais totalmente humanos que reconhecem IL-17F e/ou o complexo IL-17A/IL-17F heterodimérico, mas não reconhece IL-17A. A invenção refere-se, adicionalmente, a métodos de uso de tais anticorpos monoclonais como um terapêutico, diagnóstico e profilático.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ANTICORPO ANTI-IL-17F MONOCLONAL TOTALMENTE HUMANO ISOLADO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO O MESMO**".

PEDIDOS RELACIONADOS

5 Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório Nº U.S. 61/175.512, depositado em 5 de maio de 2009, cujos conteúdos são incorporados no presente documento por referência integralmente.

CAMPO DA INVENÇÃO

10 Esta invenção refere-se geralmente à geração de anticorpos monoclonais, por exemplo, anticorpos monoclonais completamente humanos, que reconhecem IL-17F, mas não reconhecem IL-17A, a anticorpos monoclonais, por exemplo, anticorpos monoclonais completamente humanos, que reconhecem o complexo IL-17A/IL-17F heterodimérico, e a métodos de uso de anticorpos monoclonais como terapia.

15 **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

IL-17F (também conhecido como ML-1) é um membro da família IL-17 de citosinas, que também inclui as proteínas IL-17A (também conhecidas como CTL-8, IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (também denominada IL-25). Tanto IL-17A como IL-17F são secretadas como homodímeros ligados a disulfeto que sinalizam através dos receptores IL-17R, IL-17RC, ou um complexo receptor multimérico composto de IL-17R e IL-17RC. Ambos também são coexpressos nos mesmos subconjuntos de células T (principalmente pelas células Th17 CD4⁺ T). IL-17A e IL-17F também interagem e formam um complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico.

25 Níveis elevados de IL-17F e o complexo de IL-17A/IL-17F foram associados a uma variedade de distúrbios inflamatórios e doenças autoimunes. Consequentemente, há necessidade de terapias que neutralizam as atividades biológicas de IL-17F.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

30 A presente invenção fornece anticorpos monoclonais tais como anticorpos monoclonais completamente humanos que especificamente se ligam ao complexo heterodimérico IL-17F e/ou IL-17A/IL-17F, mas não se ligam especificamente a IL-17A. IL-17F é geralmente expresso e biológica-

mente ativo como uma proteína homodimérica. Assim, o uso do termo "IL-17F" e seus equivalentes se referem à proteína homodimérica IL-17F, salvo quando indicado de outra forma. Os anticorpos da invenção são capazes de modular, por exemplo, bloquear, inibir, reduzir, antagonizar, neutralizar ou de
5 outra forma interagir com a citosina pró-inflamatória mediada por IL-17F e/ou produção de quimiocina.

Exemplos de anticorpos monoclonais da invenção incluem, por exemplo, o anticorpo 5E12, o anticorpo 41B10, o anticorpo 11C5, o anticorpo 21B10, o anticorpo 1F1 e o anticorpo 2E12. Como alternativa, o anticorpo
10 monoclonal é um anticorpo que se liga ao mesmo epítipo que o anticorpo 41B10, anticorpo 11C5, 21B10 anticorpo, anticorpo 1F1, anticorpo 2E12, anticorpo 5D3, anticorpo 22F8, anticorpo 28B11, anticorpo 41A4 e o anticorpo 43G6. Estes anticorpos são respectivamente denominados anticorpos "hulL17F". Os anticorpos hulL-17F incluem anticorpos monoclonais comple-
15 tamente humanos, bem como anticorpos monoclonais humanizados e anticorpos quiméricos.

Preferencialmente, o anticorpo monoclonal completamente humano é selecionado a partir do anticorpo 11C5, anticorpo 21B10, anticorpo 1F1, anticorpo 2E12, anticorpo 5D3, anticorpo 22F8, anticorpo 28B11, anti-
20 corpo 41A4 e anticorpo 43G6. Estes anticorpos exibem afinidade mais alta para o complexo heterodimérico IL-17F e/ou IL-17A/IL-17F do que outros anticorpos que se ligam ao complexo IL-17F e/ou IL-17A/IL-17F, tal como, por exemplo, o anticorpo 5E12 e o anticorpo 41B10. Estes anticorpos são melhores inibidores de pelo menos uma atividade ou função biológica de IL-
25 17F do que outros anticorpos que se ligam ao complexo heterodimérico IL-17F e/ou IL-17A/IL-17F, tal como, por exemplo, o anticorpo 5E12 e o anticorpo 41B10. Por exemplo, o anticorpo 11C5, o anticorpo 21B10, o anticorpo 1F1, o anticorpo 2E12, o anticorpo 5D3, o anticorpo 22F8, o anticorpo 28B11, o anticorpo 41A4 e o anticorpo 43G6 inibem uma atividade e/ou fun-
30 ção biológica de IL-17F a um maior grau do que o anticorpo 5E12 e/ou o anticorpo 41B10. Em algumas modalidades, o anticorpo 11C5, o anticorpo 21B10, o anticorpo 1F1, o anticorpo 2E12, o anticorpo 5D3, o anticorpo

22F8, o anticorpo 28B11, o anticorpo 41A4 e o anticorpo 43G6 diminuem a produção de uma citosina pró-inflamatória na presença destes anticorpos a um maior grau do que a diminuição de produção de citosina pró-inflamatória na presença de outros anticorpos que se ligam a IL-17F e/ou ao complexo heterodimérico IL-17A/IL-17F, tal como, por exemplo, o anticorpo 5E12 e/ou o anticorpo 41B10. Por exemplo, o nível de produção de citosina (por exemplo, IL-6) pró-inflamatória na presença do anticorpo 11C5, anticorpo 21B10, anticorpo 1F1, anticorpo 2E12, anticorpo 5D3, anticorpo 22F8, anticorpo 28B11, anticorpo 41A4 e anticorpo 43G6 é maior ou igual a 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99%, ou 100% inferior ao nível de produção de citosina pró-inflamatória de outros anticorpos que se ligam a IL-17F e/ou ao complexo heterodimérico IL-17A/IL-17F, tal como, por exemplo, o anticorpo 5E12 e/ou o anticorpo 41B10.

Estes anticorpos mostram especificidade para IL-17F humano e/ou complexo heterodimérico IL-17A/IL-17F humano, e foi mostrado que inibem produção de citosina mediada por IL-17F. Estes anticorpos têm especificidades distintas. Em algumas modalidades, os anticorpos hIL-17F da invenção especificamente se ligam a IL-17F, mas não se ligam especificamente a IL-17A. Preferencialmente, os anticorpos hIL-17 da invenção também se ligam especificamente ao homodímero IL-17F, mas não se ligam especificamente ao homodímero IL-17A. Em algumas modalidades, os anticorpos hIL-17F da invenção especificamente se ligam ao complexo heterodimérico IL-17A/IL-17F, mas não se ligam especificamente a IL-17A ou ao homodímero IL-17A. Em algumas modalidades, os anticorpos hIL-17F da invenção especificamente se ligam a IL-17F e ao complexo heterodimérico IL-17A/IL-17F, mas não se ligam especificamente a IL-17A ou ao homodímero IL-17A. Por exemplo, os anticorpos 11C5, 21B10, 1F1, 2E12, 41B10, 5D3, 22F8, 28B11, 41A4 e 43G6 especificamente se ligam a IL-17F, e estes anticorpos não se ligam a IL-17A ou ao homodímero IL-17A. Preferencialmente, os anticorpos hIL-17F se ligam a IL-17F e não fazem reação cruzada com IL-17A ou homodímero IL-17A. Por exemplo, 5E12, 11C5, 21B10, 1F1, 2E12, 41B10, 5D3, 22F8, 28B11, 41A4 e 43G6 se ligam a IL-17F mas não

fazem reação cruzada com IL-17A.

Os anticorpos completamente humanos da invenção contém uma região variável de cadeia pesada tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID N°s 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 e 42. Os anticorpos humanos da invenção contém uma região variável de cadeia leve tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID N°s 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 e 44. CDRs de cadeia pesada incluem uma região de VH CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID N°s 45, 48, 51, 56, 59, 64, 67 e 70; uma região de VH CDR2 que compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID N°s 46, 49, 52, 54, 57, 60, 62, 65, 68, 71 e 73; e uma região de VH CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID NOS: 47, 50, 53, 55, 58, 61, 63, 66, 69 e 72. As três CDRs de cadeia leve incluem uma região VL CDR1 que compreende uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID N°s 74, 77, 80, 85, 88, 91 e 94; uma região VL CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID N°s 75, 78, 81, 83, 86, 89, 92 e 96; e uma região VL CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID N°s 76, 79, 82, 84, 87, 90, 93, 95, 97, 98 e 99.

Preferencialmente, as CDRs de cadeia pesada incluem uma região VH CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID N°s 45, 48, 51, 64, 67 e 70; uma região VH CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo

menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID N° 46, 49, 52, 54, 62, 65, 68, 71 e 73; e uma região VH CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica a

5 uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID °s 47, 50, 53, 55, 63, 66, 69 e 72. As três CDRs de cadeia pesada incluem uma região VL CDR1 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID N°s 74, 77, 80, 85, 91 e

10 94; uma região VL CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID N°s 75, 78, 81, 83, 86, 92 e 96; e uma região VL CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos pelo menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica a uma sequência selecionada a partir do grupo que consiste das SEQ ID

15 N°s 76, 79, 82, 84, 93, 95, 97, 98 e 99, desde que quando VL CDR1 compreender uma sequência de aminoácidos que seja pelo menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência da SEQ ID N° 85, VL CDR2 compreenda uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência da SEQ ID N° 86 e

20 VL CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência da SEQ ID N° 98, e desde que quando VL CDR2 compreender uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência da SEQ ID N° 86, VL CDR1 compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência da SEQ ID N° 85 e VL CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 90%, 92%, 95%, 97% 98%, 99% ou mais idêntica à sequência da SEQ ID N° 98.

30 Os anticorpos da invenção imuno especificamente se ligam a IL-17F em que o anticorpo se liga a um epítipo que inclui um ou mais resíduos de aminoácidos ou IL-17F humana. Em algumas modalidades, os anticorpos

da invenção também se ligam especificamente ao complexo heterodimérico IL-17A/IL-17F, mas não a IL-17A, em que o anticorpo se liga a um epitopo que inclui um ou mais resíduos de aminoácidos em IL-17F humana.

Os anticorpos da invenção também incluem anticorpos completamente humanos que se ligam especificamente a IL-17F e/ou ao complexo heterodimérico IL-17A/IL-17F em que o anticorpo exibe mais do que 50% de inibição de produção de citosina pró-inflamatória mediada por IL-17F *in vitro*. Por exemplo, os anticorpos da invenção exibem mais do que 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, ou 99% de inibição de secreção de IL-6 por células estimuladas por IL-17. Conforme usado no presente documento, o termo "citosina pró-inflamatória" se refere àquelas citosinas imunorregulatórias que promovem inflamação e/ou são associadas à inflamação. Citosinas pró-inflamatórias e quimiocinas incluem, por exemplo, IL-6, IL-8, G-CSF, e GM-CSF. Quimiocinas pró-inflamatórias incluem, por exemplo, GRO- α , GRO-b, LIX, GCP-2, MIG, IP10, I-TAC, e MCP-1, RANTES, Eotaxin, SDF-1, e MIP3a.

A presente invenção também fornece métodos para tratar ou prevenir patologias associadas à atividade de IL-17F aberrante (por exemplo, produção de citosina pró-inflamatória aberrante, tal como, por exemplo, produção de IL-6 aberrante), ou aliviar um sintoma associada a tais patologias, administrando um anticorpo monoclonal da invenção (por exemplo, anticorpo monoclonal completamente humano) a um indivíduo em que tal tratamento ou prevenção é desejada. O indivíduo a ser tratado é, por exemplo, humano. O anticorpo monoclonal é administrado em uma quantidade suficiente para tratar, prevenir ou aliviar um sintoma associada à patologia. Uma quantidade de anticorpo monoclonal suficiente para tratar ou prevenir a patologia no indivíduo é, por exemplo, uma quantidade que é suficiente para reduzir sinalização de IL-17F (por exemplo, produção de uma ou mais citosinas pró-inflamatórias induzida por IL-17F tal como, por exemplo, IL-6). Conforme usado no presente documento, o termo "reduzido" se refere a uma produção diminuída de uma citosina pró-inflamatória na presença de um anticorpo monoclonal da invenção, em que a produção é, por exemplo, produ-

ção de citosina pró-inflamatória local (por exemplo, em um local do tecido inflamado) ou produção de citosina pró-inflamatória sistêmica. A sinalização de IL-17F (por exemplo, citosina pró-inflamatória induzida por IL-17F, tal como IL-6) é diminuída quando o nível de produção de citosina pró-inflamatória (por exemplo, IL-6) na presença de um anticorpo monoclonal da invenção é maior ou igual a 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 99%, ou 100% inferior a um nível controle de produção de citosina pró-inflamatória (*isto é*, o nível de produção de citosina pró-inflamatória na ausência do anticorpo monoclonal). O nível de produção de citosina pró-inflamatória (por exemplo, IL-6) é medido, por exemplo, usando as análises celulares de Fibroblastos Embrionários de Camundongo estimulados por IL-17F (MEF) aqui descritas. Aqueles versados na técnica apreciarão que o nível de produção de citosina pró-inflamatória pode ser medido usando uma variedade de análises, inclusive, por exemplo, kits ELISA comercialmente disponíveis.

As patologias tratadas e/ou prevenidas usando os anticorpos monoclonais da invenção (por exemplo, anticorpo monoclonal completamente humano) incluem, por exemplo, inflamação aguda, inflamação crônica (por exemplo, inflamação crônica associada a condições alérgicas e asma, inflamação crônica associada a condições artríticas), doenças autoimunes (por exemplo, doença de Crohn, esclerose múltipla, artrite reumatoide e outras condições artríticas autoimunes), doença do baço inflamado e rejeição a transplante.

As composições farmacêuticas de acordo com a invenção podem incluir um anticorpo da invenção e um transportador. Estas composições farmacêuticas podem ser incluídas em kits, tais como, por exemplo, kits de diagnóstico.

A presente invenção também fornece proteínas IL-17F solúveis, métodos para expressar proteínas IL-17F e métodos para purificar tais proteínas de forma solúvel.

Em algumas modalidades, a patologia a ser tratada é uma ou mais doenças autoimunes, distúrbios inflamatórios ou cânceres. Por exem-

plo, sem limitação, a patologia é artrite reumatoide e outras condições artríticas, doença de Crohn, psoríase, esclerose múltipla, doença pulmonar obstrutiva crônica e/ou asma, câncer e angiogenese.

As composições farmacêuticas de acordo com a invenção podem incluir um anticorpo da invenção e um transportador. Estas composições farmacêuticas podem ser incluídas em kits, tais como, por exemplo, kits de diagnóstico.

Aqueles versados na técnica apreciarão que os anticorpos da invenção tem uma variedade de usos. Por exemplo, as proteínas da invenção são usadas como agentes terapêuticos para prevenir a ativação de receptor de IL-17F em distúrbios tais como, por exemplo, artrite reumatoide, doença de Crohn, psoríase, esclerose múltipla, doença pulmonar obstrutiva crônica, angiogenese, asma e câncer. Os anticorpos da invenção também são usados como reagentes em kits de diagnóstico ou ferramentas de diagnóstico, ou estes anticorpos podem ser usados em análises de competição para gerar reagentes terapêuticos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 é um gráfico que descreve a progressão de pontuação clínica de artrite induzida por colágeno em camundongos usando métodos de pontuação de artrite padrão.

As figuras 2A-2F são uma série de gráficos que descrevem vários níveis séricos de citosina em camundongos imunizados com colágeno bovino do tipo II como determinado no final (dia 22). A figura 2A descreve o nível sérico detectado de necrose de tumor fator alfa (TNF- α); A figura 2B descreve o nível sérico detectado de interleucina 6 (IL-6); A figura 2C descreve o nível sérico detectado de interferon gama (IFN- γ); A figura 2D descreve o nível sérico detectado de interleucina 1 alfa (IL-1 α); A figura 2E descreve o nível sérico detectado de proteína quimiotática de monócitos (MCP-1); e a figura 2F descreve o nível sérico detectado do complexo heterodimérico de interleucina 12/interleucina 23 (IL-12/IL-23).

DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção fornece anticorpos monoclonais que se li-

gam especificamente a IL-17F. A invenção ainda fornece anticorpos que se ligam especificamente a IL-17F e ao complexo heterodimérico IL-17A/IL-17F (também referido no presente documento como o heterodímero IL-17A/IL-17F). O anticorpo é por exemplo, um anticorpo monoclonal completamente humano.

Os anticorpos da invenção se ligam especificamente a IL-17F mas não a IL-17A, em que o anticorpo se liga a um epitopo que inclui um ou mais resíduos de aminoácidos de IL-17F humana. Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção se ligam especificamente a IL-17F e ao complexo heterodimérico IL-17A/IL-17F mas não a IL-17A ou ao homodímero IL-17A, em que o anticorpo se liga a um epitopo que inclui um ou mais resíduos de aminoácidos de IL-17F humana.

Os anticorpos da presente invenção se ligam a um epitopo IL-17F com uma constante de ligação de equilíbrio (K_d) de $\leq 1 \mu\text{M}$, por exemplo, $\leq 100 \text{ nM}$, preferencialmente $\leq 10 \text{ nM}$, e mais preferencialmente $\leq 1 \text{ nM}$. Por exemplo, os anticorpos huIL-17F fornecidos no presente documento exibem uma K_d na variação aproximadamente entre $\leq 1 \text{ nM}$ à cerca de 1 pM .

A estrutura de cristal de IL-17F revela que a proteína adota uma dobra de nós de cisteína, sugerindo uma realação à superfamília de proteína de nós de cisteína. No entanto, o motive de knot de cisteína de IL-17F apenas utiliza quatro cisteínas em vez das seis cisteínas clássica para formar o nó. Como os outros membros da família de knot de cisteína, IL-17F também existe como um heterodímero com IL-17A. Acredita-se que o heterodímero IL-17A/IL-17F sinaliza através de IL-17R e/ou do complexo multimérico IL-17R/IL-17RC. Evidências recentes mostraram que os mesmos resíduos de cisteína que são utilizados para formar o heterodímero IL-17A/IL-17F são as mesmas cisteínas utilizadas na formação do homodímero IL-17F. Estes dados sugerem que o receptor para o homodímero IL-17F ou heterodímero IL-17A/IL-17F pode se ligar aos resíduos de cisteína conversados na interface do dímero, como outras proteínas na família de knot de cisteína.

Diversas funções regulatórias imunes foram relatadas para a família IL-17 de citosinas, presumidamente devido a sua função de muitas

moléculas de sinalização imunes. IL-17A, expresso como o homodímero IL-17A, e IL-17F, expresso como o homodímero IL-17F, compartilham funções biológicas muito semelhantes em alguns casos. Ambos promovem secreção de citosinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-6, IL-8, G-CSF, e GM-CSF), quimiocinas (por exemplo, GRO- α , GRO-b, LIX, GCP-2, MIG, IP10, I-TAC, e MCP-1, RANTES, Eotaxin, SDF-1, e MIP3a) e prostaglandinas (por exemplo, PGE₂) a partir de uma ampla variedade de células incluindo fibroblastos, queratinócitos, macrófagos, células epiteliais e células endoteliais. Ambos também mostraram regular *turnover* de matriz de cartilagem. O homodímero IL-17F também tem funções biológicas distintas do homodímero IL-17A tal como a capacidade de estimular proliferação e ativação de células T e células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs), e inibir angiogênese.

Os anticorpos hUL17F da invenção servem para modular, bloquear, inibir, reduzir, antagonizar, neutralizar, ou de outra forma interferir na atividade biológica de IL-17F. As atividades biológicas de IL-17F incluem, por exemplo, se ligar a IL-17R, IL-17RC e/ou ao complexo receptor multimérico IL-17R/IL-17RC, e a indução de expressão de citosina e/ou quimiocina (por exemplo, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF, GRO- α , GRO-b, LIX, GCP-2, MIG, IP10, I-TAC, and MCP-1, RANTES, Eotaxin, SDF-1, e MIP3a) em células alvo. Por exemplo, os anticorpos hUL-17F inibem completamente ou parcialmente atividade biológica de IL-17F completamente ou parcialmente modulando, bloqueando, inibindo, reduzindo antagonização, neutralizando ou de outra forma interferindo na ligação de IL-17F ao seu receptor, ou de forma diversa parcialmente ou completamente modulando, bloqueando, inibindo, reduzindo, antagonizando, neutralizando ativação de sinalização de IL-17F.

É considerado que os anticorpos hUL-17F completamente modulam, bloqueiam, inibem, reduzem, antagonizam, neutralizam ou de outra forma interferem na atividade biológica de IL-17F quando o nível de atividade de IL-17F na presença do anticorpo hUL-17F é diminuído em pelo menos 95%, por exemplo, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% em comparação ao nível de atividade de IL-17F na ausência de ligação com um anticorpo hUL-17F

descrito no presente documento. É considerado que os anticorpos hUL-17F parcialmente modulam, bloqueiam, inibem, reduzem, antagonizam, neutralizam ou de outra forma inteferem na atividade de IL-17F quando o nível de atividade de IL-17F na presenã do anticorpo hUL-17F é diminuído em me-
5 nos do que 95%, por exemplo, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% ou 90% em comparação ao nível de atividade de IL-17F na ausência de ligação com um anticorpo hUL-17F aqui descrito.

Definições

A menos que definido de outra forma, os termos científicos e
10 técnicos usados em relação à presente invenção terão os significados que são geralmente entendidos por aqueles versados na técnica. Além disso, a menos que exigido de outra forma pelo contexto, os termos no singular incluirão pluralidades e termos no plural incluirão o singular. Geralmente, as nomenclaturas utilizadas em relação a, e técnicas de, cultura de células e tecidos,
15 dos, biologia molecular, e química e hibridização de proteínas e oligo ou polinucleotídeos aqui descritas são aquelas bem conhecidas e geralmente usadas na técnica. As técnicas padrão são usadas para DNA recombinante, síntese de oligonucleotídeos e cultura e transformação de tecidos (por exemplo, eletroporação, lipofecção). As reações enzimáticas e técnicas de
20 purificação são realizadas de acordo com as especificações do fabricante ou como geralmente realizadas na técnica ou conforme descrito aqui. As técnicas e procedimentos anteriores são geralmente realizados de acordo com métodos convencionais bem conhecidos na técnica e conforme descrito em várias referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas no
25 presente relatório descritivo. Ver por exemplo, Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). As nomenclaturas utilizadas em relação a, e os procedimentos laboratoriais e técnicas de química analítica, química orgânica sintética e química medicinal e farmacêutica descritas aqui são aque-
30 las conhecidas e geralmente usadas na técnica. As técnicas padrão são usada para sínteses químicas, análises químicas, preparação farmacêutica, formulação, distribuição e tratamento de pacientes.

Conforme utilizados em conformidade com a presente divulgação, os seguintes termos, salvo indicação em contrário, serão entendidos como tendo os seguintes significados:

Conforme usados no presente documentos, os termos Interleucina-17A, IL-17A, IL17A, IL-17, IL17, CTLA8, CTLA-8, antígeno 8 associado a linfócito T citotóxico e precursor de interleucina-17A são sinônimos e podem ser usados alternadamente. Cada um destes termos se refere à proteína homodimérica, exceto quando indicado de outra forma.

Conforme usados no presente documento, os termos interleucina-17F, IL-17F, IL17F, ML-1, ML1, interleucina-24, IL-24, IL24 e precursor de interleucina-17F são sinônimos e podem ser usados alternadamente. Cada um destes termos se refere à proteína homodimérica IL-17F, exceto quando indicado de outra forma.

Conforme usado no presente documento, o termo "anticorpo" se refere a moléculas de imunoglobulina e porções imunologicamente ativas de moléculas de imunoglobulina (Ig), isto é, moléculas que contém um local de ligação de antígeno que especificamente se liga (imunorreage) com um antígeno. "Especificamente liga" ou "imunorreage com" ou "direcionado contra" significa que o anticorpo reage com um ou mais determinantes antigênicos do antígeno desejado e não reage com outros polipeptídeos ou faz ligação em afinidade muito mais baixa ($K_d > 10^{-6}$). Os anticorpos incluem, mas não são limitados a, fragmentos de F_{ab} , F_{ab}' e $F_{(ab)2}$ de cadeia única, policlonais, monoclonais, quiméricos, scFvs, e uma biblioteca de expressão de F_{ab} .

A unidade estrutural de anticorpo básica é conhecida por compreender um tetrâmero. Cada tetrâmero é composto de dois pares idênticos de cadeias de polipeptídeos, cada par tendo uma cadeia "leve" (cerca de 25 kDa) e uma cadeia "pesada" (cerca de 50-70 kDa). A porção amino-terminal de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos primariamente responsáveis pelo reconhecimento de antígenos. A porção carboxi-terminal de cada cadeia define uma região constante primariamente responsável pela função efetora. No geral, as moléculas de anticorpo obtidas a partir de humanos são relacionadas a qualquer uma das

classes IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que diferem uma da outra pela natureza da cadeia pesada presente na molécula. Certas clases também têm subclasses, como IgG₁, IgG₂, e outras. Além disso, em humanos, a cadeia leve pode ser uma cadeia capa ou uma cadeia lambda.

5 O termo "anticorpo monoclonal " (MAb) ou "composição de anticorpo monoclonal", conforme usado no presente documento, se refere a uma população de moléculas de anticorpo que contém apenas uma espécie molecular de molécula de anticorpo consistindo de um produto de gene de cadeia leve única e um produto de gene de cadeia pesada única. Especificamente, as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) do anticorpo monoclonal são idênticas em todas as moléculas da população. MAb
10 contém um local de ligação a antígeno capaz de imunorreagir com um epítopo específico do antígeno caracterizado por uma afinidade de ligação única para o mesmo.

15 No geral, as moléculas de anticorpo obtidas a partir de humanos se referem a qualquer uma das classes IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que diferem uma da outra pela natureza da cadeia pesada presente na moléculas. Certas classes também têm subclasses, tais como IgG₁, IgG₂, e outras. Além disso, em humanos, a cadeia leve pode ser uma cadeia capa ou uma cadeia lambda.
20 da.

O termo "local de ligação a antígeno" ou "porção de ligação" se refere à parte da molécula de imunoglobulina que participa na ligação ao antígeno. O local de ligação a antígeno é formado por resíduos de aminoácidos das regiões variáveis N-terminal ("V") das cadeias pesada ("H") e leve ("L").
25 Três trechos altamente divergentes nas regiões V das cadeias leve e pesada, denominadas "regiões hipervariáveis", são interpostos entre trechos flanqueadores mais conservados conhecidos como "regiões de estrutura", ou "FRs". Assim, o termo "FR" se refere a sequências de aminoácidos que são naturalmente encontradas entre, e adjacentes a, regiões hipervariáveis em imunoglobulinas. Em uma molécula de anticorpo, as três regiões hipervariáveis de uma cadeia leve e as três regiões hipervariáveis de uma cadeia pesada são dispostas uma em relação a outra em espaço tridimensional pa-
30

ra formar uma superfície de ligação a antígeno. A superfície de ligação a antígeno é complementar à superfície tridimensional de um antígeno ligado, e as três regiões hipervariáveis de cada cadeia leve e pesada são denominadas "regiões determinantes de complementaridade" ou "CDRs." A atribuição de aminoácidos a cada domínio está em conformidade com as definições de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), ou Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia *et al.* Nature 342:878-883 (1989).

Conforme usado no presente documento, o termo "epitopo" inclui qualquer determinante de proteína capaz de se ligar especificamente a uma imunoglobulina ou fragmento da mesma, ou a um receptor de célula T. O termo "epitopo" inclui qualquer determinante de proteína capaz de se ligar especificamente a uma imunoglobulina ou receptor de célula T. Os determinantes epitópicos geralmente consistem de agrupamentos de moléculas de superfície quimicamente ativa tais como cadeias laterais de aminoácidos ou açúcares e geralmente tem características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas. Um anticorpo é dito como se ligando especificamente a um antígeno quando a constante de dissociação é $\leq 1 \mu\text{M}$; por exemplo, $\leq 100 \text{ nM}$, preferencialmente $\leq 10 \text{ nM}$ e mais preferencialmente $\leq 1 \text{ nM}$.

Conforme usados no presente documento, os termos "ligação imunológica" e "propriedades de ligação imunológica" refere-se às interações não covalentes do tipo que ocorrem entre uma molécula de imunoglobulina e um antígeno para o qual a imunoglobulina é específica. A resistência ou afinidade de interações de ligação imunológica podem ser expressas em termos da constante de dissociação (K_d) da interação, em que uma K_d menor representa uma afinidade maior. As propriedades de ligação imunológica se polipeptídeos selecionados podem ser quantificadas usando métodos bem conhecidos na técnica. Um destes métodos inclui medir as taxas de formação e dissociação de local de ligação a antígeno/complexo de antígenos, em que tais taxas dependem das concentrações dos parceiros de complexo, afinidade da interação e parâmetros geométicos que influenciam i-

gualmente a taxas em ambas as direções. Assim, tanto a "constante na taxa" (K_{on}) como a "constante fora da taxa" (K_{off}) podem ser determinadas por cálculo das concentrações e as taxas reais de associação e dissociação. (Ver Nature 361:186-87 (1993)). A razão de K_{off}/K_{on} permite o cancelamento de todos os parâmetros não relacionados à afinidade, e é igual à constante de dissociação K_d . (Ver, *geralmente*, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Um anticorpo da presente invenção é dito como se ligando especificamente a IL-17F e/ou ao heterodímero IL-17A/IL-17F, quando a constante de ligação de equilíbrio (K_d) é $\leq 1 \mu M$, preferencialmente $\leq 100 \text{ nM}$, mais preferencialmente $\leq 10 \text{ nM}$, e mais preferencialmente $\leq 100 \text{ pM}$ à cerca de 1 pM , conforme medido por análises tais como análises de ligação a radioligantes ou análises semelhantes conhecidas por aqueles versados na técnica.

O termo "polinucleotídeo isolado" conforme usado no presente documento significará um polinucleotídeo de origem sintética, cDNA ou genômica ou alguma combinação destas, que, em virtude de sua origem o "polinucleotídeo isolado" (1) não é associado a todo ou a uma porção de um polinucleotídeo em que o "polinucleotídeo isolado" é encontrado na natureza, (2) é operacionalmente ligado a um polinucleotídeo ao qual não é ligado em natureza, ou (3) não ocorre na natureza como parte de uma sequência maior. Polinucleotídeos em conformidade com a invenção incluem as moléculas de ácido nucleico que codificam as moléculas de imunoglobulina de cadeia pesada apresentadas nas SEQ ID N°s 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37 e 41, e as moléculas de ácido nucleico que codificam as moléculas de imunoglobulina de cadeia leve representadas nas SEQ ID N°s 3, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31, 35, 39 e 43.

O termo "proteína isolada" no presente documento significa uma proteína de cDNA, RNA recombinante, ou origem sintética ou alguma combinação destes, que em vista de sua origem, ou fonte de derivação, a "proteína isolada" (1) não é associada a proteínas encontradas na natureza, (2) é livre de outras proteínas da mesma fonte, por exemplo, livre de proteínas marinhas, (3) é expressa por uma célula a partir de espécies diferentes, ou

(4) não ocorre na natureza.

O termo "polipeptídeo" é usado no presente documento herein como um termo genérico para se referir a uma proteína nativa, fragmentos ou análogos de uma sequência de polipeptídeos. Portanto, fragmentos de proteína nativa e análogos são espécies do gênero polipeptídeo. Os polipeptídeos em conformidade com a invenção compreendem as moléculas de imunoglobulina de cadeia pesada representadas nas SEQ ID N°s 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, 34, 38 e 42, e as moléculas de imunoglobulina de cadeia leve representadas nas SEQ ID N°s 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40 e 44, bem como as moléculas de anticorpo formadas por combinações compreendendo as moléculas de imunoglobulina de cadeia pesada com moléculas de imunoglobulina de cadeia leve, tais como moléculas de imunoglobulina de cadeia leve capa, e vice versa, bem como seus fragmentos e análogos.

O termo "de ocorrência natural" conforme usado no presente documento aplicado a um objeto se refere ao fato de que um objeto pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, uma sequência de polipeptídeos ou polinucleotídeos que está presente em um organismo (incluindo vírus) que pode ser isolado de uma fonte na natureza e que não foi intencionalmente modificado pelo homem em laboratório ou de outra forma tem ocorrência natural.

O termo "operacionalmente ligado" conforme usado no presente documento se refere a posições assim descritas em uma relação que permite às mesmas funcionarem de sua forma pretendida. Uma sequência controle "operacionalmente ligada" a uma sequência de codificação é ligada de forma que a expressão da sequência de codificação é alcançada sob condições compatíveis com as sequências controle.

O termo "sequência controle" conforme usado no presente documento se refere a sequências de polinucleotídeos que são necessárias para realizar a expressão e processamento de sequências de codificação às quais são ligadas. A natureza de tais sequências controle difere dependendo do organismo hospedeiro em procariotos, tais sequências controle geralmente incluem promotor, local de ligação ribossomal e sequência de terminação

de transcrição em eucariotos, geralmente, tais sequências controle incluem promotores e sequência de terminação de transcrição. O termo "sequências controle" se destina a incluir, no mínimo, todos os componentes cuja presença é essencial para expressão e processamento, e também pode incluir componentes adicionais cuja presença é vantajosa, por exemplo, sequências líder e sequências de parceiros de fusão. O termo "polinucleotídeo" conforme referido no presente documento significa um boro polimérico de nucleotídeos de pelo menos 10 bases de comprimento, ribonucleotídeos ou deoxinucleotídeos ou uma forma modificada de qualquer um dos tipos de nucleotídeo. O termo inclui formas de DNA de filamento único e duplo.

O termo "oligonucleotídeo" referido no presente documento inclui nucleotídeos de ocorrência natural e modificados ligados por ligações de oligonucleotídeos de ocorrência natural e ocorrência não natural. Os oligonucleotídeos são um subconjunto de polinucleotídeos geralmente compreendendo um comprimento de 200 bases ou menos. Preferencialmente os oligonucleotídeos tem de 10 a 60 bases de comprimento e mais preferencialmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 a 40 bases de comprimento. Oligonucleotídeos geralmente são de filamento único, por exemplo, para sondas, embora oligonucleotídeos possam ser de filamento duplo, por exemplo, para uso na construção de um mutante de gene. Os oligonucleotídeos da invenção são oligonucleotídeos senso ou antissenso.

O termo "nucleotídeos de ocorrência natural" referido no presente documento inclui deoxiribonucleotídeos e ribonucleotídeos. O termo "nucleotídeos modificados" referido no presente documento inclui nucleotídeos com grupos açúcar modificados ou substituídos e semelhantes. O termo "ligações de oligonucleotídeos" referido no presente documento inclui ligações de oligonucleotídeos tais como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenotioato, fosforodiselenotioato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforonmidato, entre outros. Ver por exemplo, LaPlanche *et al.* Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec *et al.* J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein *et al.* Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon *et al.* Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon *et al.* Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108

(F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec *et al.* U.S. Patent No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Um oligonucleotídeo pode incluir um marcador para detecção, se desejado.

5 O termo "seletivamente hibridiza" referido no presente documento significa ligar detectavelmente e especificamente. Polinucleotídeos, oligonucleotídeos e seus fragmentos em conformidade com a invenção seletivamente hibridizam a filamentos de ácido nucleico sob condições de hibridização e lavagem que minimizam quantidades consideráveis de ligação detectável a ácidos nucleicos não específicos. Condições de estringência alta podem ser usadas para alcançar condições de hibridização seletiva conforme conhecido na técnica e discutido no presente documento. Geralmente, a homologia de sequência de ácido nucleico entre os polinucleotídeos, oligonucleotídeos e fragmentos da invenção e uma sequência de ácido nucleico de interesse será pelo menos 80%, e mais tipicamente com homologias preferencialmente crescentes de pelo menos 85%, 90%, 95%, 99%, e 100%. Duas sequências de aminoácidos são homólogas se houver identidade parcial ou complete entre suas sequências. Por exemplo, 85% de homologia significa que 85% dos aminoácidos são idênticos quando as duas sequências são alinhadas para máxima correspondência. Lacunas (em qualquer uma das duas sequências sendo correspondidas) que podem maximizar comprimentos de lacunas correspondentes de 5 ou menos são preferenciais com 2 ou menos sendo mais preferencial. Como alternativa e de preferência, duas sequências de proteínas (ou sequências de polipeptídeos derivadas dos mesmos de pelo menos 30 aminoácidos de comprimentos) são homólogas, conforme este termo é usado no presente documento, se tiverem uma pontuação de alinhamento superior a 5 (em unidades de desvio padrão) usando o programa ALIGN com os dados de mutação e uma desvantagem de lacuna de 6 ou maior. Ver Dayhoff, M.O., em Atlas of Protein Sequence and Structure, pp. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) e Supplement 2 a este volume, pp. 1-10. As duas sequências ou suas partes são mais preferencialmente homólogas se seus aminoácidos fo-

rem maiores ou iguais a 50% idênticos quando idealmente alinhados usando o programa ALIGN. O termo "corresponde a" é usado no presente documento para significar que uma sequência de polinucleotídeos é homóloga (*isto é*, é idêntica, não estritamente relacionada de forma evolutiva) a toda ou uma
5 porção de uma sequência de polinucleotídeos de referência, ou que uma sequência de polipeptídeos é idêntica a uma sequência de polipeptídeos de referência. Em contrapartida, o termo "complementar" é usado no presente documento para significar que a sequência complementar é homóloga a toda ou uma porção de uma sequência de polinucleotídeos de referência. Para
10 ilustração, a sequência de nucleotídeos "TATAC" corresponde a uma sequência de referência "TATAC" complementar a uma sequência de referência "GTATA".

Os seguintes termos são usados para descrever as relações de sequência entre duas ou mais sequências de polinucleotídeos ou aminoácidos: "sequência de referência", "janela de comparação", "identidade de sequência", "percentagem de identidade de sequência" e "identidade substancial". Uma "sequência de referência" é uma sequência definida usada como base para uma comparação de sequências, uma sequência de referência pode ser um subconjunto de uma sequência maior, por exemplo, como um
20 segment de um cDNA de comprimento completo ou uma sequência de genes fornecida em uma listagem de sequência ou pode compreender um cDNA completo ou sequência de genes. Geralmente, uma sequência de referência tem pelo menos 18 nucleotídeos ou 6 aminoácidos de comprimento, frequentemente pelo menos 24 nucleotídeos ou 8 aminoácidos de comprimento, e com frequência pelo menos 48 nucleotídeos ou 16 aminoácidos de
25 comprimento. Uma vez que duas sequências de polinucleotídeos ou aminoácidos podem cada uma (1) compreender uma sequência (*isto é*, uma porção da sequência de polinucleotídeos ou aminoácidos completo) que é semelhante entre as duas moléculas, e (2) pode ainda compreender uma sequência que é divergente entre as duas sequências de polinucleotídeos ou
30 aminoácidos, as comparações de sequência entre duas (ou mais) moléculas são geralmente realizadas comparando as sequências das duas moléculas

em uma "janela de comparação" para identificar e comparar regiões locais de similaridade de sequência. Uma "janela de comparação", conforme usado no presente documento, se refere a um segmento conceitual de pelo menos 18 posições de nucleotídeos contíguos ou 6 aminoácidos em que uma sequência de polinucleotídeos ou sequência de aminoácidos pode ser comparada a uma sequência de referência de pelo menos 18 nucleotídeos contíguos ou sequências de 6 aminoácidos e em que a porção da sequência de polinucleotídeos na janela de comparação pode compreender adições, deleções, substituições, e semelhantes (*isto é*, lacunas) de 20% ou menos em comparação à sequência de referência (que não compreende adições ou deleções) para alinhamento ideal das duas sequências. O alinhamento ideal de sequências para alinhar uma janela de comparação pode ser conduzido pelo algoritmo de homologia local de Smith and Waterman Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), pela busca pelo método de similaridade de Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444 (1988), pelas implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks, ou pacotes do software MacVector), ou por inspeção, e melhor alinhamento (*isto é*, resultando na percentagem mais alta de homologia na janela de comparação) gerado pelos vários métodos é selecionado.

O termo "identidade de sequência" significa que duas sequências de polinucleotídeos ou aminoácidos são idênticas (*isto é*, em uma base nucleotídeo por nucleotídeo ou resíduo por resíduo) na janela de comparação. O termo "percentagem de identidade de sequência" é calculado comparando duas sequências idealmente alinhadas na janela de comparação, determinando o número de posições em que a base de ácido nucleico (por exemplo, A, T, C, G, U ou I) ou resíduo idêntico ocorre e mambas as sequências para fornecer o número de posições combinadas, dividindo o número de posições combinadas pelo número total de posições na janela de comparação (*isto é*, o tamanho da janela), e multiplicando o resultado por 100 para

fornece a percentagem de identidade de sequência. O termo "identidade substancial" conforme usado no presente documento denota uma característica de uma sequência de polinucleotídeos ou aminoácidos, em que o polinucleotídeo ou aminoácido compreende uma sequência que tem pelo menos 85% de identidade de sequência, preferencialmente pelo menos 90 ou 95% de identidade de sequência, mais geralmente pelo menos 99% de identidade de sequência em comparação a uma sequência de referência em uma janela de comparação de pelo menos 18 posições de nucleotídeos (6 aminoácidos), frequentemente em uma janela de comparação de pelo menos 24 a 48 posições de nucleotídeos (8 a 16 aminoácidos), em que a percentagem de identidade de sequência é calculada comparando a sequência de referência à sequência que pode incluir deleções ou adições que totalizam 20% ou menos da sequência de referência na janela de comparação. A sequência de referência pode ser um subconjunto ou uma sequência maior.

Conforme usado no presente documento, os vinte aminoácidos convencionais e suas abreviações seguem uso convencional. Ver *Immunology - A Synthesis* (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland7 Mass. (1991)). Os estereoisômeros (por exemplo, D-aminoácidos) dos vinte aminoácidos convencionais, aminoácidos não naturais como α -, α -aminoácidos dissustituídos, aminoácidos N-alkil, ácido láctico, e outros aminoácidos convencionais podem também ser componentes adequados para polipeptídeos da presente invenção. Exemplos de aminoácidos não convencionais incluem: 4 hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, γ -N,N,N-trimetilisina, γ -N-acetilisina, O-phosphoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, γ -N-metilarginina, e outros aminoácidos e iminoácidos semelhantes (por exemplo, 4- hidroxiprolina). Na notação de polipeptídeo usada no presente documento, a direção esquerda é a direção amino- terminal e a direção direita é a direção carboxi-terminal, em conformidade com o uso e convenção padrão.

Semelhantemente, a menos que especificado de outra forma, a extremidade esquerda de sequências de polinucleotídeos de filamento único é a extremidade 5' e a direção esquerda de sequências de polinucleotídeos

de filamento duplo é referida como a direção 5'. A direção de adição 5' 3' de transcritos de RNA nascente é referida como as regiões de sequência de direção de transcrição no filamento de DNA tendo a mesma sequência que o RNA e que são a extremidade 5' a 5' do transcrito de RNA sendo referidas
 5 como "sequências a montante", regiões de sequência no filamento de DNA tendo a mesma sequência que o RNA e que são a extremidade 3' a 3' do transcrito de RNA sendo referida como "sequências a jusante".

Conforme aplicado a polipeptídeos, o termo "identidade substancial" significa que duas sequências de peptídeos, quando idealmente alinhadas, tal como pelos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de lacuna padrão, compartilham pelo menos 80% de identidade de sequência, preferencialmente pelo menos 90% de identidade de sequência, mais preferencialmente pelo menos 95% de identidade de sequência e mais preferencialmente pelo menos 99% de identidade de sequência.

15 Preferencialmente, as posições de resíduo que não são idênticas diferem pelas substituições de aminoácidos conservadoras.

As substituições de aminoácidos conservadoras se referem à intercambialidade de resíduos tendo cadeias laterais semelhantes. Por exemplo, um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais alifáticas é glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais alifáticas-hidroxil é serina e treonina; um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais contendo amida é asparagina e glutamina; um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais aromáticas é fenilalanina, tirosina e triptofano; um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais básicas é lisina, arginina e histidina; e um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais contendo enxofre é cisteína e metionina. Grupos de substituição de aminoácidos conservadores são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginine, alanina valina, glutâmicoaspártico e asparagina-glutamina.

30 Conforme discutido no presente documento, variações menores nas sequências de aminoácidos de anticorpos ou moléculas de imunoglobulina são contempladas como sendo compreendidas pela presente invenção, desde que as variações na sequência de aminoácidos mantenham pelo me-

nos 75%, mais preferencialmente pelo menos 80%, 90%, 95%, e mais preferencialmente 99%. Especificamente, substituições de aminoácidos conservadoras são contempladas. Substituições conservadoras são aquelas que ocorrem em uma família de aminoácidos que são relacionados em suas cadeias laterais. Aminoácidos geneticamente codificados geralmente são divididos em famílias: (1) aminoácidos acídicos são aspartato, glutamato; (2) aminoácidos básicos são lisina, arginina, histidina; (3) aminoácidos não polares são alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano, e (4) aminoácidos polares não carregados são glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Os aminoácidos hidrofílicos incluem arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina e treonina. Os aminoácidos hidrofóbicos incluem alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptofano, tirosina e valina. Outras famílias de aminoácidos incluem (i) serina e treonina, que são a família alifática-hidroxi; (ii) asparagina e glutamina, que são a família contendo amida; (iii) alanina, valina, leucina e isoleucina, que são a família alifática; e (iv) fenilalanina, triptofano, e tirosina, que são a família aromática. Por exemplo, é razoável esperar que uma substituição isolada de uma leucina por uma isoleucina ou valina, um aspartato por um glutamato, uma treonina por uma serina, ou uma substituição semelhante de um aminoácido por um aminoácido estruturalmente relacionado não terá um efeito significativo na ligação ou propriedades da molécula resultante, especialmente se a substituição não envolver um aminoácido em um local de estrutura. Se uma mudança de aminoácido resulta em um peptídeo funcional pode ser determinado imediatamente analisando a atividade específica do derivado do polipeptídeo. As análises são descritas em detalhes no presente documento. Fragmentos ou análogos de anticorpos ou moléculas de imunoglobulina podem imediatamente ser preparados por aqueles versados na técnica. Terminais amino e carboxi preferenciais de fragmentos ou análogos ocorrem próximos a limites de domínios funcionais. Os domínios estruturais e funcionais podem ser identificados por comparação dos dados de sequência de nucleotídeos e/ou aminoácidos a bancos de dados de sequências públicos ou de propriedade.

Preferencialmente, os métodos de comparação computadorizados são usados para identificar motivos de sequência ou domínios de conformação de proteínas previstos que ocorrem em outras proteínas de estrutura e/ou função conhecida. Os métodos para identificar sequências de proteínas que se dobram em uma estrutura tridimensional são conhecidos. Bowie *et al.* Science 253:164 (1991). Assim, os exemplos precedentes demonstram que aqueles versados na técnica podem reconhecer motivos de sequência e conformações estruturais que podem ser usadas para definir domínios estruturais e funcionais em conformidade com a invenção.

10 As substituições de aminoácidos preferenciais são aquelas que: (1) reduzem susceptibilidade à proteólise, (2) reduzem susceptibilidade à oxidação, (3) alteram afinidade de ligação para formar complexos de proteínas, (4) alteram afinidades de ligação, e (4) conferem ou modificam outras propriedades físicoquímicas ou funcionais de tais análogos. Os análogos
15 podem incluir várias muteínas de uma sequência exceto a sequência de peptídeos de ocorrência natural. Por exemplo, substituições de aminoácidos únicos ou múltiplos (preferencialmente substituições de aminoácidos conservadoras) podem ser feitas na sequência de ocorrência natural (preferencialmente na porção do polipeptídeo fora dos domínios que formam os contatos
20 intermoleculares. Uma substituição de aminoácido conservadora não deve mudar substancialmente as características estruturais da sequência principal (por exemplo, um aminoácido de substituição não deve tender a quebrar uma hélice que ocorre na sequência principal, ou romper outros tipos de estrutura secundária que caracteriza a sequência principal). Exemplos de estruturas secundárias e terciárias de polipeptídeos conhecidas na técnica são
25 descritos em Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); e Thornton et al. Nature 354:105 (1991).

30 O termo "fragmento de polipeptídeo" conforme usado no presente documento se refere a um polipeptídeo que tem uma deleção de terminal amino e/ou carboxi, mas em que a sequência de aminoácidos remanescente

é idêntica às posições correspondentes na sequência de ocorrência natural deduzida, por exemplo, a partir de uma sequência de cDNA de comprimento completo. Os fragmentos geralmente têm 5, 6, 8 ou 10 aminoácidos de comprimento, preferencialmente pelo menos 14 aminoácidos de comprimento, mais preferencialmente pelo menos 20 aminoácidos de comprimento, geralmente pelo menos 50 aminoácidos de comprimento, e ainda mais preferencialmente pelo menos 70 aminoácidos de comprimento. O termo "análogo" conforme usado no presente documento se refere a polipeptídeos que são compostos de um segmento de pelo menos 25 aminoácidos que tem identidade substancial a uma porção de uma sequência de aminoácidos deduzida e que tem ligação específica a IL-17F sozinho ou ao heterodímero IL-17A/IL-17F (*isto é*, complexo), sob condições de ligação adequadas. Geralmente, os análogos de polipeptídeos compreendem uma substituição de aminoácido conservadora (ou adição ou deleção) com relação à sequência de ocorrência natural. Os análogos geralmente têm pelo menos 20 aminoácidos de comprimento, preferencialmente 50 aminoácidos de comprimento ou mais, e podem com frequência ser tão longos quanto um polipeptídeo de ocorrência natural.

Os análogos de peptídeos são geralmente usados na indústria farmacêutica como drogas não peptídeos com propriedades análogas às das do peptídeo modelo. Estes tipos de composto não peptídeo são denominados "miméticos de peptídeos" ou "peptidomiméticos". Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986), Veber and Freidinger TINS p.392 (1985); and Evans *et al.* J. Med. Chem. 30:1229 (1987). Tais compostos são frequentemente desenvolvidos com o auxílio de modelagem molecular computadorizada. Os miméticos de peptídeos que são estruturalmente semelhantes aos peptídeos terapeuticamente úteis podem ser usados para produzir um efeito terapêutico ou profilático equivalente. Geralmente, os peptidomiméticos são estruturalmente semelhantes a um polipeptídeo de paradigma (*isto é*, um polipeptídeo que tem uma propriedade bioquímica ou atividade farmacológica), tal como anticorpo humano, mas tem uma ou mais ligações de peptídeos opcionalmente substituídas por uma ligação selecionada a partir do grupo

que consiste de: --CH₂NH--, --CH₂S-, --CH₂-CH₂--, --CH=CH--(cis e trans), --COCH₂--, CH(OH)CH₂--, e -CH₂SO--, por métodos bem conhecidos na técnica. A substituição sistemática de um ou mais aminoácidos de uma sequência consenso por um D-aminoácido do mesmo tipo (por exemplo, D-lisina no
 5 lugar de L-lisina) pode ser usada para gerar peptídeos mais estáveis. Além disso, peptídeos restritos compreendendo uma sequência consenso ou uma variação de sequência consenso substancialmente idêntica podem ser gerados por métodos conhecidos na técnica (Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)); por exemplo, adicionando resíduos de cisteína interna
 10 capazes de formar pontes de dissulfeto intramoleculares que ciclizam o peptídeo.

O termo "agente" é usado no presente documento para denotar um composto químico, uma mistura de compostos químicos, uma macromolécula biológica ou um extrato feito de materiais biológicos.

15 Conforme usados no presente documento, os termos "marcação" ou "marcado" se referem à incorporação de um marcador detectável, por exemplo, por incorporação de um aminoácido radiomarcado ou ligação a um polipeptídeo de porções de biotínil que podem ser detectadas por avidina marcada (por exemplo, estreptavidina contendo um marcador fluorescente
 20 ou atividade enzimática que pode ser detectada por métodos ópticos ou calorimétricos). Em certas situações, a marcação ou marcador também podem ser terapêuticos. Vários métodos de marcação de polipeptídeos e glicoproteínas são conhecidos na técnica e podem ser usados. Exemplos de marcações para polipeptídeos incluem, mas não são limitados ao seguinte: radioisótopos ou radionuclídeos (por exemplo, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In,
 25 ¹²⁵I, ¹³¹I), marcações fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantanídeo), marcações enzimáticas (por exemplo, peroxidase de raiz forte, p-galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), quimioluminescente, grupos biotínil, epitopos de polipeptídeos pré-determinados reconhecidos por
 30 um reportador secundário (por exemplo, sequências de pares de zíper de leucina, locais de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação a metal, marcações de epitopos). Em algumas modalidades, as marcações

são ligadas por braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir impedimento estérico potencial. O termo "agente ou droga farmacêutica" conforme usado no presente documento se refere a um composto ou composição química capaz de induzir um efeito terapêutico desejado quando adequadamente administrado a um paciente.

Outros termos químicos no presente documento são usados para uso convencional na técnica, conforme exemplificado por The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

O termo "agente antineoplástico" é usado no presente documento para se referir a agentes que tem a propriedade funcional de inibir um desenvolvimento ou progressão de um neoplasma em um ser humano, especificamente uma lesão maligna (cancerosa), tal como um carcinoma, sarcoma, linfoma, ou leucemia. A inibição de metástase é frequentemente uma propriedade de agentes antineoplásticos.

Conforme usado no presente documento, "substancialmente puro" significa que uma espécie objeto é a espécie predominante presente (*isto é*, em uma base molar é mais abundante do que qualquer outra espécie individual na composição), e preferencialmente uma fração substancialmente purificada é uma composição em que a espécie objeto compreende pelo menos cerca de 50% (em base molar) de todas as espécies macromoleculares presentes.

Geralmente, uma composição substancialmente pura compreende mais do que cerca de 80% de todas as espécies macromoleculares presentes na composição, mais preferencialmente mais do que cerca de 85%, 90%, 95% e 99%. Mais preferencialmente, a espécie objeto é purificada para homogeneidade essencial (espécies contaminantes não pode ser detectada na composição por métodos de detecção convencionais) em que a composição consiste essencialmente de uma especial macromolecular única.

Doenças autoimunes incluem, por exemplo, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS, que é uma doença viral com um componente

autoimune), alopecia areata, espondilite anquilosante, síndrome antifosfolípidos, doença de Addison autoimune, anemia hemolítica autoimune, hepatite autoimune, doença do ouvido interno autoimune (AIED), síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS), púrpura trombocitopênica autoimune (ATP),

5 doença de Behcet, cardiomiopatia, espru celíaco-dermatite herpetiforme; síndrome de disfunção imune de fadiga crônica (CFIDS), polineuropatia demielinante inflamatória crônica (CIPD), penfigoide cicatricial, doença de aglutinina fria, síndrome da crista, doença de Crohn, doença de Degos, dermatomiosite-juvenil, lúpus discoide, crioglobulinemia misturada essencial, fibromialgia-fibromiosite, doença de Graves, síndrome de Guillain-Barré, tireoidite de Hashimoto, fibrose pulmonar idiopática, púrpura trombocitopenia idiopática (ITP), nefropatia de IgA, diabetes mellitus dependente de insulina, artrite crônica juvenil (doença de Still), artrite reumatoide juvenil, doença de Ménière, doença do tecido conectivo misturada, esclerose múltipla, miastenia

10 grave, anemia perniciosa, poliarterite nodosa, policondrite, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiosite e dermatomiosite, agamaglobulinemia primária, cirrose biliar primária, psoríase, artrite psoriática, fenômenos de Raynaud, síndrome de Reiter, febre reumática, artrite reumatoide, sarcoidose, escleroderma (esclerose sistêmica progressiva (PSS), também conhecida como esclerose sistêmica (SS)), síndrome de Sjögren, síndrome de "stiff-man", lúpus eritematoso sistêmico, arterite de Takayasu, arterite temporal/arterite de células gigantes, colite ulcerativa, uveíte, vitiligo e granulomatose de Wegener.

Distúrbios inflamatórios incluem, por exemplo, distúrbios inflamatórios crônicos e agudos. Exemplos de distúrbios inflamatórios incluem doença de Alzheimer, asma, alergia atópica, alergia, aterosclerose, asma bronquial, eczema, glomerulonefrite, doença de enxerto vs. hospedeiro, anemias hemolíticas, osteoartrite, sepse, derrame, transplante de tecido e órgãos, vasculite, retinopatia diabética e lesão pulmonar induzida por ventilador.

25

30

Anticorpos huIL-17F

Os anticorpos monoclonais da invenção (por exemplo, anticorpos monoclonais completamente humanos) se ligam a IL-17F, e em algumas modalidades, ao complexo heterodimérico IL-17A/IL-17F, mas não se ligam a IL-17A ou ao homodímero IL-17A. Estes anticorpos monoclonais têm a capacidade de inibir produção de citosinas pró-inflamatórias induzidas por IL-17F (por exemplo, IL-6). A inibição é determinada, por exemplo, por análises celulares de fibroblasto embrionário de camundongo estimulado por IL-17F (MEF) descritas no presente documento.

Exemplos de anticorpos da invenção incluem, por exemplo, o anticorpo 5E12, o anticorpo 41B10, o anticorpo 11C5, o anticorpo 21B10, o anticorpo 1F1, o anticorpo 2E12, o anticorpo 5D3, o anticorpo 22F8, o anticorpo 28B11, o anticorpo 41A4 e o anticorpo 43G6 descritos no presente documento. Estes anticorpos mostram especificidade para IL-17F humana e/ou para o complexo heterodimérico IL-17A/IL-17F, e mostraram inibir indução de IL-17F humana da citosina pró-inflamatória IL-6 *in vitro*.

Cada um dos anticorpos monoclonais huIL-17F descritos no presente documento incluem uma região variável de cadeia pesada (VH) e uma região variável de cadeia leve (VL), conforme mostrado no aminoácido e sequências de ácido nucleico correspondentes listadas abaixo.

O anticorpo 5E12 inclui uma região variável de cadeia pesada (SEQ ID N°2) codificada pela sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID N°1, e uma região variável de cadeia leve (SEQ ID N°4) codificada pela sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID N°3.

>Sequência de ácido nucleico 5E12 VH (SEQ ID N°1)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC
CTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGA
TGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGA
GTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTACCATAGGCTATGCGGAC
TCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCC
CTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATT
ACTGTGCAAAAGAACTGTATATCAGTGAAGTGGGACTCCTACTCCTACGG

TATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

> Sequência de aminoácido 5E12 VH (SEQ ID N°2)

QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAP

GKGLEWVSGISWNSGTIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLILQMNSLRAEDTA

5 LYYCAKELYISDWDSYSYGMWVGQGTTVTVSS

> Sequência de ácido nucleico 5E12 VL (SEQ ID N°3)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTC

TCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAG

CAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAG

10 GCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAG

GTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAG

ACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGC

TCACCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

> Sequência de aminoácido 5E12 VL (SEQ ID N°4)

15 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSILAWYQQKPGQ

APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS

PFGGGTKVEIK

O anticorpo 41B10 inclui uma região variável de cadeia pesada (SEQ ID N°6) codificada pela sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ

20 ID N°5, e uma região variável de cadeia leve (SEQ ID N°8) codificada pela sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID N°7.

> Sequência de ácido nucleico 41B10 VH (SEQ ID N°5)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGC

CTGGGGGGTCCCTTAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCATTTTCAG

25 TAACGCCTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGG

AATGGGTTGGCCGTATTAAGCAAACTGATGGTGGGACAACAGACTA

CGTTGCACCCGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAA

AACACCCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACAGCC

GTATATTACTGTACCACATCGTATAGCAGTTACTGGTTCCTACTACTT

30 TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

> Sequência de aminoácido 41B10 VH (SEQ ID N°6)

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAP

GKGLEWVGRIKSKTDGGTTDYVAPVKGRFTISRDDSKNTLILQMNSLKTED
TAVYYCTTSYSSYWFPYYFDYWQGGLVTVSS

> Sequência de ácido nucleico 41B10 VL (SEQ ID N°7)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATC
5 TGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGGTATTAG
CAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAGTC
CCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTC
AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTG
CAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCC
10 GATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

> Sequência de aminoácido 41B10 VL (SEQ ID N°8)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKA
PKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSTP
ITFGQGTRLEIK

15 O anticorpo 11C5 inclui uma região variável de cadeia pesada
(SEQ ID N°10) codificada pela sequência de ácido nucleico mostrada na
SEQ ID N°9, e uma região variável de cadeia leve (SEQ ID N°12) codificada
pela sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID N°11. A sequência de
aminoácido da região variável de cadeia leve para o anticorpo 11C5 inclui
20 mutações na extremidade 5' para converter os resíduos nos resíduos encon-
trados na sequência de linhagem germinativa humana correspondente. A
versão que não sofreu mutação da sequência de aminoácido da região vari-
ável de cadeia leve para o anticorpo 11C5 é mostrada na SEQ ID N° 102, e
a versão que não sofreu mutação da sequência de ácido nucleico da região
25 variável de cadeia leve para o anticorpo 11C5 é mostrada na SEQ ID N°
103.

> Sequência de ácido nucleico 11C5 VH (SEQ ID N° 9)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGC
CTGGGGCCTCAGTGAAGGTT
30 TCCTGCAAGGCATCTGGATACACCTTCACCATCTATTATTG
CACTGGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAATAATCAACCCTAG

TGGTGGTAGGACAAACTAC
 GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATGACCAGGGACC
 CGTCCACGAACACAGTCTAC
 ATGGAAGTGAAGCAGCCTGACATCTGAGGACGCGGCCGTGT
 5 ATTACTGTGCGAGAGGGGAA
 TTTAGCAGTGGCTGGCTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCA
 CGGTCACCGTCTCCTCA
> Sequência de aminoácido 11C5 VH (SEQ ID Nº10)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTIYLHWVRQAPG
 10 QGLEWMGIINPSGGRTNY
 AQKFQGRVTMTRDPSTNTVYMELSSLTSEDAAVYYCARGEFS
 SGWLDYWGGGTTVTVSS
> Sequência de ácido nucleico 11C5 VL (SEQ ID Nº11)
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATC
 15 TGTAGGAGACAGAGTCACC
 ATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGC
 CTGGTATCAGCATAAACCA
 GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT
 GCAAAGTGGGGTCCCATCA
 20 AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
 CATCAGCAGCCTGCAGCCT
 GAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAATAGTTTC
 CCGCTCACTTTCGGCGGA
 GGGACCAAGGTGGAGATCAAA
 25 > Sequência de aminoácido 11C5 VL (SEQ ID Nº12)
 DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQHKPGK
 APKLLIYAASSLQSGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGK
 VEIK
 30 > Sequência de ácido nucleico que não sofreu mutação 11C5 VL
(SEQ ID Nº102)
 GACATCGTGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATC

TGTAGGAGACAGAGTCACC
 ATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGC
 CTGGTATCAGCATAAACCA
 GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT
 5 GCAAAGTGGGGTCCCATCA
 AGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
 CATCAGCAGCCTGCAGCCT
 GAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAATAGTTTC
 CCGCTCACTTTCGGCGGA
 10 GGGACCAAGGTGGAGATCAAA
> Sequência de aminoácido que não sofreu mutação 11C5 VL
(SEQ ID N°103)
 DIVMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQHKPGK
 APKLLIYAASSLQSGVPS
 15 RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTK
 VEIK
 O anticorpo 21B10 inclui uma região variável de cadeia pesada
 (SEQ ID N°14) codificada pela sequência de ácido nucleico mostrada na
 SEQ ID N°13, e uma região variável de cadeia leve (SEQ ID N°16) codifica-
 20 da pela sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID N°15.
> Sequência de ácido nucleico 21B10 VH (SEQ ID N° 13)
 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC
 CTGGGGGGGTCCCTGAGACTC
 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCAT
 25 GAACTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTGGTG
 GTAGTAGTACCATATACTAC
 GCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
 TGCCAAGAACTCACTGTAT
 30 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACACGGCTGTGT
 ATTACTGTGCGAGAGAGGGC
 TATGTTTCGGGGACCTATTACAATACTACTACTACGGTATGGAC

GTCTGGGGCCAAGGGACC

ACGGTCACCGTCTCCTCA

> Sequência de aminoácido 21B10 VH (SEQ ID N°14)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAP

5 GKGLEWVSYISGGSSTIYY

ADSVKGRFTISRDNANKNSLILQMNSLRDEDTAVYYCAREGYVS

GTYYNYYYGMDVWGQGT

TVTVSS

> Sequência de ácido nucleico 21B10 VL (SEQ ID N°15)

10 GAAATTGTGTTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCT

CCAGGGGAAAGAGCCACC

CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGTTACTTAGC

CTGGTACCAACAGAAACCT

GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCACCCAACAG

15 GGCCACTGGCATCCCAGCC

AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC

CATCAGCAGCCTAGAGCCT

GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGG

TCGCTCACTTTTCGGCGGA

20 GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

> Sequência de aminoácido 21B10 VL (SEQ ID N°16)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSILAWYQQKPGQA

PRLLIYDAPNRATGIPA

RFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWSLTFGGGT

25 KVEIK

O anticorpo 1F1 inclui uma região variável de cadeia pesada (SEQ ID N°18) codificada pela sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID N°17, e uma região variável de cadeia leve (SEQ ID NO 20) codificada pela sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID N°19. A sequência de aminoácido da região variável de cadeia leve para o anticorpo 1F1 inclui mutações na extremidade 5' para converter os resíduos nos resíduos encontrados na sequência de linhagem germinativa humana corres-

30

pondente. A versão que não sofreu mutação da sequência de aminoácido da região variável de cadeia leve para o anticorpo 1F1 é mostrada na SEQ ID N° 104, e a versão que não sofreu mutação da sequência de ácido nucleico da região variável de cadeia leve para o anticorpo 1F1 é mostrada na SEQ

5 ID N° 105.

> Sequência de ácido nucleico 1F1 VH (SEQ ID N°17)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC
CTGGGGGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGTCATG
10 AGCTGGGTCCGCCAGGT
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTC
GTGGTGGTAACACATTCTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTAT
15 CTGCAAATGGACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTAT
ATTACTGTGCGAAAGATGAT
CGGCGTATAGCAGCAGGTAGTTTTGACTATTGGGGCCAAGG
GACCACGGTCACCGTCTCC
TCA

20 > Sequência de aminoácido 1F1 VH (SEQ ID N°18)

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYVMSWVRQVP
GKGLEWWSAISGRGGNTFY
ADSVKGRFTISRDNKNTLILQMDSLRAEDTAVYYCAKDDRRIA
AGSFDYWGGGTTVTVS
25 S

> Sequência de ácido nucleico 1F1 VL (SEQ ID N°19)

GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATC
TGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGC
30 CTGGTATCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGTCTCCAGTTT
GGAAAGTGGGGTCCCATCA

AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
 CATCAGCAGCCTGCAGCCT
 GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACC
 CTCTCACTTTTCGGCGGA
 5 GGGACCAAGGTGGAGATCAAA
 > Sequência de aminoácido 1F1 VL (SEQ ID N°20)
 AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSALAWYQQKPGKA
 PKLLIYDVSSLESGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTK
 10 VEIK
 > Sequência de ácido nucleico que não sofreu mutação 1F1 VL
 (SEQ ID N°104)
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATC
 TGTAGGAGACAGAGTCACC
 15 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGC
 CTGGTATCAGCAGAAACCA
 GGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGTCTCCAGTTT
 GGAAAGTGGGGTCCCATCA
 AGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
 20 CATCAGCAGCCTGCAGCCT
 GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACC
 CTCTCACTTTTCGGCGGA
 GGGACCAAGGTGGAGATCAAA
 > Sequência de aminoácido que não sofreu mutação 1F1 VL
 25 (SEQ ID N°105)
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSALAWYQQKPGKA
 PKLLIYDVSSLESGVPS
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTK
 VEIK
 30 O anticorpo 2E12 inclui uma região variável de cadeia pesada
 (SEQ ID N°22) codificada pela sequência de ácido nucleico mostrada na
 SEQ ID N°21, e uma região variável de cadeia leve (SEQ ID NO 24) codifi-

cada pela sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID N°23.

> Sequência de ácido nucleico 2E12 VH (SEQ ID N° 21)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC
GGGGGGGGTCCCTGAGACTC
5 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATAGCAT
GAACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTTACATACATTAGTAGTAG
TAGTAGTGCCATATACTAC
GCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
10 TGCCAAGAACTCACTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACACGGCTGTGT
ATTACTGTGCGAGAGAGGGC
TATGCTTCGGGGAGGTATTACAATACTACTACTACGGTATGGA
CGTCTGGGGCCAAGGGACC
15 ACGGTCACCGTCTCCTCA

> Sequência de aminoácido 2E12 VH (SEQ ID N° 22)

EVQLVESGGGLVQRGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAP
GKGLEWISYISSSSSAIYY
ADSVKGRFTISRDNANKNSLILQMNSLRDEDTAVYYCAREGYAS
20 GRYYNYYYGMDVWGQGT
TVTVSS

> Sequência de ácido nucleico 2E12 VL (SEQ ID N°23)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCT
CCAGGGGAAAGAGCCACC
25 CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTGGC
CTGGTACCAACAGAAACCT
GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAG
GGCCACTGGCATCCCAGCC
AGGTTCAGTGTCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC
30 CATCAGCAGCCTAGAGCCT
GAAGATTTTGCGGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAGCTG
GTCGCTCACTTTCGGCGGA

GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

> Sequência de aminoácido 2E12 VL (SEQ ID N°24)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSILAWYQQKPGQA

PRLLIYDASNRATGIPA

5 RFSVSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSSWSLTFGGGTK
VEIK

O anticorpo 5D3 inclui uma região variável de cadeia pesada (SEQ ID N°26) codificada pela sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID N°25, e uma região variável de cadeia leve (SEQ ID N°28) codificada pela sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID N°27.

10

> Sequência de ácido nucleico 5D3 VH (SEQ ID N° 25)

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC

CTGGCAGGTCCTGAGACTC

TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCATG

15 CACTGGGTCCGGCAAGCT

CCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGA

ATAGTGGTAGCAGAGGCTAT

GCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA

CGCCAAGAACTCCCTGTAT

20 CTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTA
TTACTGTGCAAAAGATATG

GTCTACGCTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCA

CCGTCTCCTCA

> Sequência de aminoácido 5D3 VH (SEQ ID N° 26)

25 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAP
GKGLEWVSGISWNSGSRGY

ADSVKGRFTISRDNANKNSLILQMNSLRAEDTALYYCAKDMVYA

LDVWGQGTTVTVSS

> Sequência de ácido nucleico 5D3 VL (SEQ ID N° 27)

30 GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTC
TCCAGGGGAAAGAGCCACC

CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTTTTAGCGGCAGCTACTT

AGCCTGGTACCAGCAGAAA
 CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATACATCCAG
 CAGGGCCACTGGCATCCCA
 GACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCT
 5 CACCATCAGCAGACTGGAG
 CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTACG
 TGGACGTTTCGGCCAAGGG
 ACCAAGGTGGAAATCAAA
 > Sequência de ácido nucleico 5D3 VL (SEQ ID N° 28)
 10 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSFSGSILAWYQQKPGQ
 APRLLIYDTSSRATGIP
 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTWTFGQG
 VEIK
 O anticorpo 22F8 inclui uma região variável de cadeia pesada
 15 (SEQ ID N°30) codificada pela sequência de ácido nucleico mostrada na
 SEQ ID N°29, e uma região variável de cadeia leve (SEQ ID N°32) codifica-
 da pela sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID N°31.
 > Sequência de ácido nucleico 22F8 VH (SEQ ID N° 29)
 GAGGTGCAGTTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC
 20 CTGGGGGGTCCCTGAGACTC
 TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCAT
 GAACTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAACTATTAGTGGTC
 GTGGTGGTAGCATATACTAC
 25 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACA
 ATTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTAT
 ATTACTGTGCGAAAGAGGAG
 GCTACCTGGGACTTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGG
 30 TCACCGTCTCCTCA
 > Sequência de aminoácido 22F8 VH (SEQ ID N° 30)
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAP

GKGLEWVSTISGRGGSIIYY

ADSVKGRFTISRDN SKNTLILQMNSLRAEDTAVYYCAKEEATW
DFDYWGQGTTTVTVSS

> Sequência de ácido nucleico 22F8 VL (SEQ ID N° 31)

5 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCT
CCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTTCTTAGC
CTGGTTCCAACAGAAACCT
GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAG
10 GGCCACTGGCATCCCAGCC
AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC
CATCAGCAGCCTAGAGCCT
GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGG
CCTCCGACGTTCCGGCAA
15 GGGACCAAGGTGGAAATCAAA

> Sequência de aminoácido 22F8 VL (SEQ ID N° 32)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWFQQKPGQA
PRLLIYDASNRATGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGT
20 KVEIK

O anticorpo 28B11 inclui uma região variável de cadeia pesada (SEQ ID N°34) codificada pela sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID N°33, e uma região variável de cadeia leve (SEQ ID N°36) codificada pela sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID N°35.

25 > Sequência de ácido nucleico 28B11 VH (SEQ ID N° 33)

CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGC
CTGGAGGGTCCCTGAGACTC
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAACTACTACATG
ACCTGGATCCGCCAGGCT
30 CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTTCATACATTAGTAGTAC
TGGTGGTAACATCTACTAC
GCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAA

CGCCCAGAATTCACTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGT
 ATTACTGTGCGAGAGATGGG
 GGTGTAATAATCTCAACTGCTATGTTTGA CTATTGGGGCCAA
 5 GGGACCACGGTCACCGTC
 TCCTCA
> Sequência de aminoácido 28B11 VH (SEQ ID N° 34)
 QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMTWIRQAPG
 KGLEWISYISSTGGNIYY
 10 ADSVKGRFTISRDN AQNSLILQMNSLRAEDTAVYYCARDGGVII
 STAMFDYWGQGTTTVT
 SS
> Sequência de ácido nucleico 28B11 VL (SEQ ID N° 35)
 GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCCTCCTCCCTGTCTGCATC
 15 TG TAGGAGACAGAGTCACC
 ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGC
 CTGGTATCAGCAGAAACCA
 GGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTT
 GGAAAGTGGGGTCCCATCA
 20 AGGCTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
 CATCAGCAGCCTGCAGCCT
 GAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACC
 CGCTCACTTTTCGGCGGA
 GGGACCAAGGTGGAGATCAAA
 25 > Sequência de aminoácido 28B11 VL (SEQ ID N° 36)
 AIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSALAWYQQKPGKA
 PKLLIYDASSLESGVPS
 RLSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFN SYPLTFGGGTK
 VEIK
 30 O anticorpo 41A4 inclui uma região variável de cadeia pesada
 (SEQ ID N°38) codificada pela sequência de ácido nucleico mostrada na
 SEQ ID N°37, e uma região variável de cadeia leve (SEQ ID N°40) codifica-

da pela sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID N°39.

> Sequência de ácido nucleico 41A4 VH (SEQ ID N° 37)

```

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC
CTGGCAGGTCCCTGAGACTC
5      TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTGTGCCATG
      CACTGGGTCCGGCAAGCT
      CCAGGGAAGGGCCTGGAATGGGTCTCAGGTATTAGTTGGA
      ATAGTGGTAGCGTATACTAT
      GCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAA
10     CGCCAAGAATTCCCTGTAT
      CTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTA
      TTACTGTACAAAAGAAAAA
      TACAACCTGGAACGACGAGGGGGAATACTTCTACGGAATGGA
      CGTCTGGGGCCAAGGGACC
15     ACGGTCACCGTCTCCTCA

```

> Sequência de aminoácido 41A4 VH (SEQ ID N° 38)

```

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDCAMHWVRQAP
GKGLEWWSGISWNSGSVYY
      ADSVKGRFTISRDNANKNSLILQMNSLRAEDTALYYCTKEKYNW
20     NDEGEYFYGMDVWGQGT
      TVTVSS

```

> Sequência de ácido nucleico 41A4 VL (SEQ ID N° 39)

```

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCT
CCAGGGGAAAGAGCCACC
25     CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTT
      AGCCTGGTACCAGCAGAAA
      CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAG
      CAGGGCCACTGGCATCCCA
      GACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCT
30     CACCATCAGCAGACTGGAG
      CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGC
      TCTTTCGGCGGAGGGACC

```

AAGGTGGAGATCAAA

> Sequência de aminoácido 41A4 VL (SEQ ID N° 40)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSILAWYQQKPGQ

APRLLIYGASSRATGIP

5 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSFGGGTKV
EIK

O anticorpo 43G6 inclui uma região variável de cadeia pesada (SEQ ID N°42) codificada pela sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID N°41, e uma região variável de cadeia leve (SEQ ID N°44) codificada pela sequência de ácido nucleico mostrada na SEQ ID N°43.

> Sequência de ácido nucleico 43G6 VH3 (SEQ ID N° 41)

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC

CTGGGGGGTCCCTGAGACTC

TCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCAT

15 GAACTGGGTCCGCCAGGCT

CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACATTAGTAGTG

GTAGTAGTACCATATACTAC

GCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA

TGCCAAGAACTCACTGTAT

20 CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACACGGCTGTGT

ATTACTGTGCGAGAGAGGGC

TATGTTTCGGGGACCTATTACAACTACTACTACGGTATGGAC

GTCTGGGGCCAAGGGACC

ACGGTCACCGTCTCCTCA

25 > Sequência de aminoácido 43G6 VH3 (SEQ ID N° 42)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAP

GKGLEWVSYISSGSSTIYY

ADSVKGRFTISRDNANKNSLILQMNSLRDEDTAVYYCAREGYVS

GTYYNYYYGMDVWGQGT

30 TVTVSS

> Sequência de ácido nucleico 43G6 VL3 (SEQ ID N° 43)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCT

CCAGGGGAAAGAGCCACC
 CTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGTTACTTAGC
 CTGGTACCAACAGAAACCT
 GGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCACCCAACAG
 5 GGCCACTGGCATCCCAGCC
 AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC
 CATCAGCAGCCTAGAGCCT
 GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGG
 TCGCTCACTTTTCGGCGGA
 10 GGGACCAAGGTGGAGATCAAA
 > Sequência de aminoácido 43G6 VL3 (SEQ ID N° 44)
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSILAWYQQKPGQA
 PRLLIYDAPNRATGIPA
 RFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQRSNWSLTFGGGT
 15 KVEIK

Os anticorpos hUL-17F da invenção também incluem, por exemplo, regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (CDRs VH) mostradas na Tabela 1, CDRs de cadeia leve (CDRs VL) mostradas na Tabela 2, e suas combinações.

Tabela 1. Sequências de CDR VH de clones de anticorpo que se ligam a, e neutralizam atividade biológica de IL-17F

Clone ID	CDR1pesada	CDR2pesada	CDR3pesada	Família de gene
11C5	IYILH (SEQ ID N°45)	IINPSGGRTNYAQFQG (SEQ ID N°46)	GEFSSGWLDY (SEQ ID N°47)	IGHV1-46
21B10	SYSMN (SEQ ID N°48)	YISGGSSTIYYADSVKG (SEQ ID N°49)	EGVSGTYNYNYGMDV (SEQ ID N° 50)	IGHV3-48
1F1	SYVMS (SEQ ID N°51)	AISGRGGNTFYADSVKG (SEQ ID N°52)	DDRRIAAGSFDY (SEQ ID N°53)	IGHV3-23
2E12	SYSMN (SEQ ID N°48)	YISSSSAIYYADSVKG (SEQ ID N° 54)	EGYASGRYNYNYGMDV (SEQ ID N°55)	IGHV3-48
5E12 IgG4	DYAMH (SEQ ID N°56)	GISWNSGTIGYADSVKG (SEQ ID N° 57)	ELYISDWDSYSYGMDV (SEQ ID N°58)	IGHV3-9
41B10 IgG4	NAWMS (SEQ ID N° 59)	RIKSKTDGGTTDYVAPVKG (SEQ ID N° 60)	SYSSYWFPPYFDY (SEQ ID N° 61)	IGHV3-15
5D3	DYAMH (SEQ ID N°56)	GISWNSGSRGYADSVKG (SEQ ID N° 62)	DMVYALDV (SEQ ID N°63)	IGHV3-9

22F8	SYAMN (SEQ ID N°64)	TISGRGGSIIYADSVKG (SEQ ID N°65)	EEATWDFDY (SEQ ID N°66)	IGHV3-23
28B11	NYMT (SEQ ID N°67)	YISSTGGNIYYADSVKG (SEQ ID N°68)	DGGVIISTAMFDY (SEQ ID N°69)	IGHV3-11
41A4	DCAMH (SEQ ID N°70)	GISWNSGSVYYADSVKG (SEQ ID N°71)	EKYNWNDEGEYFYGMDV (SEQ ID N°72)	IGHV3-9
43G6	SYSMN (SEQ ID N°48)	YISSGSSTIYYADSVKG (SEQ ID N°73)	EGYVSGTYNNYYYGMDV (SEQ ID N°50)	IGHV3-48

Tabela 2. Sequências de CDR VL de clones de anticorpo que se ligam a, e neutralizam IL-17F

Clone ID	CDR1leve	CDR2 leve	CDR3 leve	Família de gene
11C5	RASQGISSWLA (SEQ ID N°74)	AASSLQS (SEQ ID N°75)	ANSFPLT (SEQ ID N°76)	IGKV1-12 IGKJ4
21B10	RASQSVSSILA (SEQ ID N°77)	DAPNRAT (SEQ ID N°78)	RSNWSLT (SEQ ID N°79)	IGKV3-11 IGKJ4
1F1	RASQGISSALA (SEQ ID N°80)	DVSSLES (SEQ ID N° 81)	FNSYPLT (SEQ ID N°82)	IGKV1D-13 IGKJ4
2E12	RASQSVSSILA (SEQ ID N° 77)	DASNRAT (SEQ ID N°83)	RSSWSLT (SEQ ID N°84)	IGKV3-11 IGKJ4
5E12	RASQSVSSSILA (SEQ ID N°85)	GASSRAT (SEQ ID N°86)	QQYGSSP (SEQ ID N°87)	IGKV3-20
41B10	RASQGISSWLA (SEQ ID N°88)	AASSLQS (SEQ ID N°89)	QQYNSYPIT (SEQ ID N°90)	IGKV1D-16
5D3	RASQSFSGSILA (SEQ ID N°91)	DTSSRAT (SEQ ID N°92)	QQYGTWT (SEQ ID N°93)	IGKV3-20
22F8	RASQSVSSFLA (SEQ ID N°94)	DASNRAT (SEQ ID N°83)	QQRSNWPPT (SEQ ID N°95)	IGKV3-11
28B11	RASQGISSALA (SEQ ID N°80)	DASSLES (SEQ ID N°96)	QQFNSYPLT (SEQ ID N°97)	IGKV1D-13
41A4	RASQSVSSSILA (SEQ ID N°85)	GASSRAT (SEQ ID N°86)	QQYGSS (SEQ ID N°98)	IGKV3-20
43G6	RASQSVSSILA (SEQ ID N°77)	DAPNRAT (SEQ ID N°78)	QQRSNWSLT (SEQ ID N°99)	IGKV3-11

Os aminoácidos compreendendo as regiões de determinação de complementaridade (CDR) são definidos por E.A. Kabat et al. (Ver Kabat, EA, *et al.*, Sequences of Protein of immunological interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office (1991)).

Também são incluídos na invenção anticorpos que se ligam ao mesmo epítipo que os anticorpos descritos no presente documento. Por exemplo, os anticorpos da invenção se ligam especificamente a IL-17F e/ou ao complexo heterodimérico IL-17A/IL-17F, em que o anticorpo se liga a um epítipo que inclui um ou mais resíduos de aminoácidos em IL-17F humana (N° de Acesso AAH70124). Em algumas modalidades, os anticorpos da in-

venção se ligam especificamente a IL-17F e ao complexo heterodimérico IL-17A/IL-17F, em que o anticorpo se liga a um epítipo em IL-17F humana (por exemplo, N° de Acesso AAH70124).

5 Aqueles versados na técnica reconhecerão que é possível determinar, sem experimento indevido, se um anticorpo monoclonal (por exemplo, anticorpo monoclonal completamente humano) tem a mesma especificidade que um anticorpo monoclonal da invenção (por exemplo, clones 5E12, 41B10, 11C5, 21B10, 1F1, 2E12, 5D3, 22F8, 28B11, 41A4 e 43G6) verificando se o primeiro impede o último de se ligar a IL-17F e/ou ao complexo heterodimérico IL-17A/IL-17F. Se o anticorpo monoclonal sendo testa-
10 do competir com o anticorpo monoclonal da invenção, conforme mostrado por uma diminuição em ligação pelo anticorpo monoclonal da invenção, os dois anticorpos monoclonais se ligam ao mesmo, ou ao epítipo proxima-mente relacionado.

15 Um método alternativo para determinar se um anticorpo monoclonal tem a especificidade do anticorpo monoclonal da invenção é pré-incubar o anticorpo monoclonal da invenção com IL-17F solúvel e/ou complexos de proteínas heterodiméricas IL-17A/IL-17F solúveis e depois adicionar o anticorpo monoclonal que está sendo testado para determinar se o anti-
20 corpo monoclonal que está sendo testado é inibido em sua capacidade de se ligar a IL-17F e/ou ao complexo IL-17A/IL-17F heterodimérico. Se o anticorpo monoclonal que está sendo testado for inibido, então, com toda a probabilidade, tem a mesma, ou funcionalmente equivalente, especificidade epitépica que o anticorpo monoclonal da invenção.

25 A triagem de anticorpos monoclonais da invenção também pode ser realizada, por exemplo, através da medição da produção de citocina e/ou de quimiocina IL-17F-induzida (por exemplo, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF, GRO- α , GRO-b, LIX, GCP-2, MIG, IP10, I-TAC e MCP-1, RANTES, Eotaxin, SDF-1 e MIP3a) e determinar se o anticorpo monoclonal de teste é capaz de
30 modular, bloquear, inibir, reduzir, antagonizar, neutralizar ou interferir com produção de citocina e/ou de quimiocina IL-17F-induzida.

Vários procedimentos conhecidos na técnica podem ser utiliza-

dos para a produção de anticorpos monoclonais direcionados contra IL-17F, ou contra seus derivados, fragmentos, análogos ou homólogos ortólogos. (Ver, por exemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow E e Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, incorporado aqui por referência). Anticorpos totalmente humanos são moléculas de anticorpos em que toda a sequência de ambas as cadeias leve e pesada, incluindo as CDRs, surge de genes humanos. Esses anticorpos são chamados aqui de "anticorpos humanos", ou "anticorpos totalmente humanos". Anticorpos monoclonais humanos são preparados, por exemplo, usando os procedimentos descritos nos exemplos fornecidos abaixo. Anticorpos monoclonais humanos também podem ser preparados usando a técnica trioma; a técnica de hibridoma de células B humano (ver Kozbor, *et al.*, 1983 *Immunol Today* 4: 72); e a técnica de hibridoma EBV para a produção de anticorpos monoclonais humanos (ver Cole, *et al.*, 1985 Em: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Anticorpos monoclonais humanos podem ser utilizados e podem ser produzidos usando hibridomas humanos (ver Cote, *et al.*, 1983. *Proc Natl Acad Sci EUA* 80: 2026-2030) ou transformando células B humanas com vírus Epstein Barr *in vitro* (ver Cole, *et al.*, 1985 Em: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Os anticorpos são purificados por técnicas bem conhecidas, como a cromatografia de afinidade, utilizando proteína A ou proteína G, que fornece principalmente a fração IgG de soro imune. Posteriormente, ou alternativamente, o antígeno específico que é o alvo da imunoglobulina procurada, ou um epítipo do mesmo, podem ser imobilizados em uma coluna para purificar o anticorpo imune específico por cromatografia de imunoafinidade. A purificação de imunoglobulinas é discutida, por exemplo, por D. Wilkinson (*The Scientist*, publicado por The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, N°. 8 (17 de Abril, 2000), pp. 25-28).

Os anticorpos da invenção (por exemplo, 5E12, 41B10, 11C5, 21B10, 1F1, 2E12, 5D3, 22F8, 28B11, 41A4 e 43G6) são anticorpos monoclonais totalmente humanos. Anticorpos monoclonais que modulam, bloque-

am, inibem, reduzem, antagonizam, neutralizam ou interferem na produção de citocinas pró-inflamatórias mediada pela IL-17F são gerados, por exemplo, através da imunização de um animal com IL-17F, como, por exemplo, IL-17F murino, de rato, ou humano, ou um fragmento imunogênico derivado, ou variante do mesmo. Alternativamente, o animal é imunizado com células transfectadas com um vetor contendo uma molécula de ácido nucleico que codifica IL-17F, de modo que IL-17F é expresso e associado à superfície das células transfectadas. Alternativamente, os anticorpos são obtidos por triagem de uma biblioteca que contém sequências de domínio de ligação de anticorpo ou antígeno para a ligação com IL-17F. Esta biblioteca é preparada, por exemplo, em bacteriófago, como fusões de proteína ou peptídeo a uma proteína de revestimento bacteriófago que se expressa na superfície das partículas de fago montadas e nas sequências de codificação de DNA contidas dentro das partículas de fagos (ou sela, "biblioteca de exibição de fagos"). Os hibridomas resultantes das fusões de mieloma/células B são então testados para reatividade a IL-17F.

Os anticorpos monoclonais são preparados, por exemplo, usando métodos de hibridoma, tais como aqueles descritos por Kohler e Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). Em um método de hibridoma, um camundongo, hamster, animal ou outro hospedeiro apropriado, normalmente é imunizado com um agente imunizante para provocar linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se ligarão especificamente ao agente imunizante. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*.

O agente imunizante incluirá normalmente o antígeno de proteína, um fragmento seu, ou uma proteína de fusão dos mesmos. Geralmente, linfócitos do sangue periférico são usados se células de origem humana foram desejadas, ou células do baço, ou células de linfonodos são usadas se fontes de mamíferos não humanos forem desejadas. Os linfócitos são então fundidos com uma linhagem celular imortalizada usando um agente de fusão adequado, como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Linhagens de células imortalizadas são geralmente célu-

las de mamíferos transformadas, particularmente células do mieloma de roedor, de origem bovina e humana. Normalmente, linhagens de células de mieloma de rato ou camundongo são empregadas. As células de hibridoma podem ser cultivadas em um meio de cultura adequado que contém de preferência uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou a sobrevivência de células não fundidas imortalizadas. Por exemplo, se as células parentais não têm a enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas tipicamente incluirá hipoxantina, aminopterina e timidina ("meio HAT"), substâncias as que impedem o crescimento de células HGPRT-deficientes.

Linhagens de células imortalizadas preferidas são aquelas que se fundem de forma eficiente, suportam a expressão de nível estável elevado de anticorpos pelas células produtoras de anticorpos selecionadas, e são sensíveis a um meio, tal como meio HAT. Linhagens de células imortalizadas mais preferidas são linhagens de mieloma murino, que pode ser obtido, por exemplo, de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California e a Coleção de Cultura de Tipos Americana, Manassas, Virginia. Linhagens de células de mieloma humano e heteromieloma camundongo-humano também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais. (ver Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63)).

O meio de cultura no qual as células de hibridoma são cultivadas pode ser analisado para a presença de anticorpos monoclonais contra o antígeno. De preferência, a especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, como radioimunoensaio (RIA), ou ensaio imunoenzimático indireto (ELISA). Tais técnicas e ensaios são conhecidos na técnica. A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal pode, por exemplo, ser determinada pela análise Scatchard de Munson e Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980). Além disso, em aplicações terapêuticas de anticorpos monoclonais, é importante identificar anticorpos tendo um alto

grau de especificidade e uma alta afinidade de ligação para o antígeno alvo.

Depois que as células de hibridoma desejadas são identificadas, os clones podem ser subclonados limitando-se os procedimentos de diluição e cultivados por métodos padrão. (ver Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Meios de cultura adequados para este fim incluem, por exemplo, Meio de Eagle Modificado de Dulbecco e meio de RPMI-1640. Alternativamente, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como ascites em um mamífero.

Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones podem ser isolados ou purificados do meio de cultura ou fluido de ascite pelos procedimentos de purificação de imunoglobulina convencional, tais como, por exemplo, proteína A-Sefarose, cromatografia de hidroxilapatita, gel eletroforese, diálise ou cromatografia de afinidade.

Anticorpos monoclonais também podem ser feitos por métodos de DNA recombinante, tais como os descritos na Patente U.S. N°. 4.816.567. O DNA que codifica os anticorpos monoclonais da invenção pode ser prontamente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas de oligonucleotídeos que são capazes de se ligarem especificamente a genes que codificam as cadeias pesadas e leves de anticorpos murinos). As células de hibridoma da invenção servem como uma fonte preferida deste DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são então transfectados em células hospedeiras, como células COS de símios, células de ovário de hamster chinês (CHO), ou células de mieloma que não produzem proteína de imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. O DNA também pode ser modificado, por exemplo, substituindo-se a sequência de codificação para domínios constantes de cadeia pesada e leve humanas no lugar das sequências murinas homólogas (ver Patente U.S. N°. 4.816.567; Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994)) ou unindo covalentemente à sequência de codificação de imunoglobulina, toda ou em parte da sequência de codificação para uma imunoglobulina não polipeptídica. Essa imunoglobulina não polipeptídica pode ser substituída pelos

domínios constantes de um anticorpo da invenção, ou pode ser substituída pelos domínios variáveis de um sítio de combinação de antígeno de um anticorpo da invenção para criar um anticorpo quimérico bivalente.

Anticorpos Humanos e Humanização de Anticorpos

5 Os anticorpos monoclonais da invenção incluem anticorpos completamente humanos ou anticorpos humanizados. Estes anticorpos são adequados para a administração a seres humanos sem gerar uma resposta imune pelo ser humano contra a imunoglobulina administrada.

10 Um anticorpo hUL-17F é gerado, por exemplo, usando os procedimentos descritos nos exemplos fornecidos abaixo.

Em outros métodos alternativos, um anticorpo hUL-17F é desenvolvido, por exemplo, utilizando métodos de exibição de fagos que usam anticorpos contendo apenas sequências humanas. Essas abordagens são bem conhecidas na técnica, por exemplo, em WO92/01047 e na Pat. U.S. N° 15 6.521.404, que são incorporados por referência. Nesta abordagem, uma biblioteca combinatória de fagos portando pares aleatórios de cadeias leves e pesadas é triada por meio de fonte natural ou recombinante de IL-17F ou fragmentos do mesmo. Em outra abordagem, um anticorpo hUL-17F pode ser produzido por um processo em que pelo menos uma etapa do processo 20 inclui a imunização de um transgênico, animal não humano com a proteína IL-17F humana. Nesta abordagem, alguns dos loci da cadeia endógena pesada e/ou capa leve deste animal não humano xenogénico foram desativados e são incapazes de fazer o rearranjo necessário para gerar genes que codificam imunoglobulinas em resposta a um antígeno. Além disso, pelo 25 menos um locus de cadeia pesada humana e pelo menos um locus de cadeia leve humana foram transfectados estavelmente no animal. Assim, em resposta a um antígeno administrado, os loci humanos se reorganizam para fornecer genes que codificam regiões variáveis humanas imuno-específicas para o antígeno. Após a imunização, portanto, o xenocamundongo produz 30 células B que secretam imunoglobulinas totalmente humanas.

Uma variedade de técnicas é bem conhecida na técnica de produzir animais não humanos xenogénicos. Por exemplo, ver Pat. U.S. N°

6.075.181 e N° 6.150.584, que são aqui incorporadas por referência em sua totalidade. Esta estratégia geral foi demonstrada em relação a geração das primeiras cepas XenoMouse™, como publicado em 1994. Ver Green *et al.* Nature Genetics 7:13-21 (1994), que é aqui incorporada por referência em sua totalidade. Ver também, Patente U.S. N°s 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598, 6.075.181 e 5.939.598 e Patente Japonesa N°s 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 e 3 068 507 B2 e Patente Europeia N° EP 0 463 151 B1 e Pedidos de Patente Internacional N° WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 e membros da família relacionados.

10 Em uma abordagem alternativa, outros têm utilizado uma abordagem de "minilocus" na qual um locus de Ig exógena é imitado através da inclusão de peças (genes individuais) do locus de Ig. Assim, um ou mais genes VH, um ou mais genes DH, ou m ou mais genes JH, uma região mu constante, e uma segunda região constante (de preferência uma região gama constante) são formadas em uma construção para inserção em um animal. 15 Ver por exemplo, Patente U.S. N°s 5.545.806; 5.545.807; 5.591.669; 5.612.205; 5.625.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.643.763; 5.661.016; 5.721.367; 5.770.429; 5.789.215; 5.789.650; 5.814.318; 5.877; 397; 5.874.299; 6.023.010; e 6.255.458; e Patente Europeia N° 0 546 073 B1; e 20 Pedido de Patente Internacional N°s WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 e WO 98/24884 e membros da família relacionados.

A geração de anticorpos humanos a partir de camundongos, em 25 que, através da fusão microcelular, grandes pedaços de cromossomos ou cromossomos inteiros foram introduzidos, também tem sido demonstrada. Ver o Pedido de Patente Europeia N°s 773 288 e 843 961.

Respostas de anticorpos humanos anticamundongo (HAMA) levaram a indústria a preparar anticorpos quiméricos ou humanizados. Embora 30 os anticorpos quiméricos tenham uma região humana constante e uma região imune variável, espera-se que certas respostas de anticorpos humanos antiquiméricos (HACA) serão observadas, especialmente em utilizações crô-

nicas ou multidoses do anticorpo. Assim, seria desejável fornecer anticorpos totalmente humanos contra IL-17F e/ou o complexo IL-17A/IL-17F heterodimérico, a fim de anular ou mitigar as referências e/ou efeitos de resposta de HAMA ou HACA.

- 5 A produção de anticorpos com imunogenicidade reduzida também é realizada através de humanização, quimerização e técnicas de exibição que usam bibliotecas apropriadas. Será apreciado que anticorpos murinos ou anticorpos de outras espécies podem ser humanizados ou primatizados usando técnicas bem conhecidas na técnica. Ver por exemplo, Winter e
- 10 Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) e Wright *et al.* *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992). O anticorpo de interesse pode ser projetado por técnicas de DNA recombinante para substituir o CH1, CH2, CH3, domínios de dobradiça e/ou o domínio de estrutura com a sequência humana correspondente (ver WO 92/102190 e Patente U.S. N°s 5.530.101, 5.585.089,
- 15 5.693.761, 5.693.792, 5.714.350 e 5.777.085). Além disso, o uso de Ig cDNA para a construção de genes quiméricos de imunoglobulina é conhecido na técnica (Liu *et al.* *P.N.A.S.* 84:3439 (1987) e *J. Immunol.* 139:3521 (1987)). O mRNA é isolado de uma célula de hibridoma ou outra célula que produz o anticorpo e é utilizado para produzir cDNA. O cDNA de interesse pode ser
- 20 amplificado pela reação em cadeia da polimerase utilizando iniciadores específicos (Pat. U.S. N°s 4.683.195 w 4.683.202). Alternativamente, uma biblioteca é feita e selecionada para isolar a sequência de interesse. A sequência de DNA que codifica a região variável do anticorpo é então fundida às sequências de região constante humanas. As sequências de genes de
- 25 regiões constantes humanas podem ser encontradas em Kabat *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of immunological Interest*, N.I.H. publicação N°. 91-3242. Genes humanos da região C estão prontamente disponíveis a partir de clones conhecidos. A escolha do isotipo será guiada pelas funções efectoras desejadas, tais como fixação de complemento, ou atividade em citotoxicidade celular dependente de anticorpos. Isotipos preferenciais são IgG1, IgG3 e
- 30 IgG4. Qualquer uma das regiões constantes de cadeia leve humana, kappa ou lambda pode ser usada. O anticorpo quimérico e humanizado é então ex-

presso por métodos convencionais.

Fragmentos de anticorpos, como Fv, F(ab')₂ e Fab podem ser preparados por clivagem da proteína intacta, por exemplo, por protease ou clivagem química. Alternativamente, um gene truncado é projetado. Por exemplo, um gene quimérico que codifica uma porção do fragmento F(ab')₂ incluiria sequências de DNA que codificam o domínio CH1 e a região de dobradiça da cadeia H, seguida por um códon de parada translacional para produzir a molécula truncada.

Sequências de consenso de regiões H e L J podem ser usadas para projetar oligonucleotídeos para uso como iniciadores para introduzir sítios de restrição úteis na região J para ligação posterior de segmentos da região V com segmentos da região C humana. O cDNA da região C pode ser modificado por mutagênese sítio-dirigida para colocar um sítio de restrição na posição análoga na sequência humana.

Vetores de expressão incluem plasmídeos, retrovírus, YACs, e-pissomas EBV-derivados e similares. Um vetor conveniente é aquele que codifica uma sequência de imunoglobulina CL ou CH humana funcionalmente completa, com sítios de restrição apropriados projetados de modo que qualquer sequência VL ou VH pode ser facilmente inserida e expressa. Em tais vetores o splicing ocorre geralmente entre o sítio doador de splice na região J inserida e o sítio aceitador de splice anterior à região C humana, e também nas regiões de splice que ocorrem dentro dos exons CH humanos. A poliadenilação e a terminação de transcrição ocorrem em sítios cromossômicos nativos a jusante das regiões de codificação. O anticorpo quimérico resultante pode ser associado a qualquer promotor forte, incluindo LTRs retrovirais, por exemplo, promotor SV-40 precoce, (Okayama *et al.* Mol. Cell. Bio. 3:280 (1983)), Rous sarcoma virus LTR (Gorman *et al.* P.N.A.S. 79:6777 (1982)), e vírus da leucemia murina de moloney LTR (Grosschedl *et al.* Cell 41:885 (1985)). Além disso, como será apreciado, os promotores nativos de Ig e similares podem ser usados.

Além disso, anticorpos humanos ou anticorpos de outras espécies podem ser gerados através de tecnologias do tipo exibição, incluindo,

sem limitação, exibição de fago, exibição retroviral, exibição ribossomal e outras técnicas, utilizando técnicas bem conhecidas na técnica e as moléculas resultantes podem ser submetidas à maturação adicional, como maturação de afinidade, técnicas estas que são bem conhecidas na técnica. Wright *et al.* Crit. Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992), Hanes e Pluckthun PNAS EUA 94:4937-4942 (1997) (exibição ribossomal), Parmley e Smith Gene 73:305-318 (1988) (exibição fagos), Scott, TIBS, vol. 17:241-245 (1992), Cwirla *et al.* PNAS EUA 87:6378-6382 (1990), Russel *et al.* Nucl. Acids Research 21:1081-1085 (1993), Hoganboom *et al.* Immunol. Reviews 130:43-68 (1992), Chiswell e McCafferty TIBTECH; 10:80-8A (1992), e Patente U.S. N°. 5.733.743. Se tecnologias de exibição são utilizadas para produzir anticorpos que não são humanos, esses anticorpos podem ser humanizados, como descrito acima.

Usando estas técnicas, os anticorpos podem ser gerados para células que expressam IL-17F, IL-17F em si, formas de epitopos de IL-17F ou peptídeos do mesmo, e bibliotecas de expressão dos mesmos (ver, por exemplo, Patente U.S. N°. 5.703.057) que podem posteriormente ser classificados como descrito acima para as atividades descritas aqui.

Os anticorpos huIL-17F da invenção podem ser expressos por um vetor contendo um segmento de DNA que codifica o anticorpo de cadeia única descrito acima.

Estes podem incluir vetores, lipossomas, DNA nu, DNA adjuvante-assistido, pistola de gene, cateteres, etc. Vetores incluem conjugados químicos, como descrito em WO 93/64701, que tem uma fração de direcionamento (por exemplo, um ligante para um receptor de superfície celular), e uma fração de ligação de ácido nucleico (por exemplo, polilisina), vetor viral (por exemplo, um vector viral de DNA ou RNA), proteínas de fusão, como descrito em PCT/US 95/02140 (WO 95/22618) que é uma proteína de fusão contendo uma fração-alvo (por exemplo, um anticorpo específico para uma célula-alvo) e uma fração de ligação de ácido nucleico (por exemplo, uma protamina), plasmídeos, fago, etc. Os vetores podem ser cromossômicos, não cromossômicos, ou sintéticos.

Vetores preferidos incluem vetores virais, proteínas de fusão e conjugados químicos. Vetores retrovirais incluem vírus da leucemia murina de moloney. Vetores de DNA viral são preferidos. Estes vetores incluem vetores pox, como vetores orthopox ou avipox, vetores do vírus da herpes, como um vetor do vírus da herpes simplex I (HSV) (ver Geller, A. I. *et al.*, J. Neurochem, 64:487 (1995); Lim, F., *et al.*, in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A. I. *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A. 90:7603 (1993); Geller, A. I., *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci EUA 87:1149 (1990), vetores de adenovírus (ver LeGal LaSalle *et al.*, Science, 259:988 (1993); Davidson, *et al.*, Nat. Genet 3:219 (1993); Yang, *et al.*, J. Virol. 69:2004 (1995) e vaetores de vírus adeno-associados (ver Kaplitt, M. G., *et al.*, Nat. Genet. 8:148 (1994).

Vetores pox virais introduzem o gene no citoplasma das células. Vetores do vírus avipox resultam em apenas uma expressão de curto prazo do ácido nucleico. Vetores adenovírus, vetores do vírus adeno-associados e vetores do vírus da herpes simplex (HSV) são os preferidos para a introdução do ácido nucleico em células neurais. O vetor do adenovírus resulta em uma expressão de prazo menor (cerca de 2 meses) do que o vírus adeno-associado (cerca de 4 meses), que por sua vez é menor do que vetores HSV. O vetor em particular escolhido dependerá da célula-alvo e da condição a ser tratada. A introdução pode ser através de técnicas padrão, por exemplo, infecção, transfecção, transdução, ou transformação. Exemplos de modos de transferência de genes incluem, por exemplo, DNA nu, precipitação de CaPO_4 , dextrano DEAE, eletroporação, fusão de protoplastos, lipofecção, microinjeção celular e vetores virais.

O vetor pode ser empregado para direcionar essencialmente qualquer célula-alvo desejada. Por exemplo, a injeção estereotáxica pode ser usada para direcionar os vetores (por exemplo, adenovirus, HSV) a um local desejado. Além disso, as partículas podem ser entregues por infusão intracerebroventricular (icv) utilizando um sistema de infusão de mini-bomba, como um Sistema de Infusão SynchroMed. Um método baseado no fluxo de massa, denominado convecção, também se provou eficaz no fornecimento

de grandes moléculas a áreas extensas do cérebro e pode ser útil na distribuição do vetor para a célula-alvo. (ver Bobo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 91:2076-2080 (1994); Morrison *et al.*, Am. J. Physiol. 266:292-305 (1994)). Outros métodos que podem ser usados incluem cateteres, injeção
 5 intravenosa, parenteral, intraperitoneal e subcutânea, e via oral e ou outras vias de administração conhecidas.

Estes vetores podem ser usados para expressar grandes quantidades de anticorpos que podem ser usados em uma variedade de maneiras. Por exemplo, para detectar a presença de IL-17F em uma amostra. O
 10 anticorpo também pode ser usado para tentar ligar e interromper a sinalização relacionada a IL-17F.

Técnicas podem ser adaptadas para a produção de anticorpos de cadeia única específicos para uma proteína antigênica da invenção (ver, por exemplo, Patente U.S. N° 4.946.778). Além disso, os métodos podem
 15 ser adaptados para a construção de bibliotecas de expressão de Fab (ver, por exemplo, Huse, *et al.*, 1989 Science 246: 1275-1281) para permitir a identificação rápida e eficaz de fragmentos monoclonais F_{ab} com a especificidade desejada para uma proteína ou derivados, fragmentos, análogos, ou homólogos da mesma. Fragmentos de anticorpos que contêm os idiotipos
 20 para um antígeno de proteína podem ser produzidos por técnicas conhecidas na técnica, incluindo, mas não limitadas a: (i) um fragmento $F_{(ab')_2}$ produzido pela digestão da pepsina de uma molécula de anticorpo; (ii) um fragmento F_{ab} gerada pela redução das pontes dissulfeto de um fragmento $F_{(ab')_2}$; (iii) um fragmento F_{ab} gerado pelo tratamento da molécula de anticorpo com
 25 papaína e um agente redutor, e (iv) fragmentos F_v .

A invenção também inclui fragmentos F_v , F_{ab} , $F_{ab'}$ e $F_{(ab')_2}$ anti-IL-17F, anticorpos de cadeia única anti-IL-17F, anticorpos biespecíficos anti-IL-17F e anticorpos heteroconjugados anti-IL-17F.

Anticorpos biespecíficos são anticorpos que têm especificidades
 30 de ligação para pelo menos dois antígenos diferentes. No presente caso, uma das especificidades de ligação é para IL-17F. O segundo alvo de ligação é qualquer outro antígeno e, vantajosamente, é uma proteína da super-

fície celular, ou receptor, ou subunidade receptora.

Métodos para produção de anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. Tradicionalmente, a produção recombinante de anticorpos biespecíficos é baseada na coexpressão de dois pares de cadeia pesada/cadeia leve de imunoglobulina, onde as duas cadeias pesadas têm especificidades diferentes (Milstein e Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Por causa do agrupamento aleatório de cadeias de imunoglobulina pesadas e leves, estes hibridomas (quadromas) produzem uma mistura potencial de dez moléculas de anticorpos diferentes, das quais apenas uma possui a estrutura biespecífica correta. A purificação da molécula correta geralmente é realizada por etapas de cromatografia de afinidade. Procedimentos semelhantes são divulgados em WO 93/08829, publicado em 13 de Maio de 1993, e em Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Domínios de anticorpo variáveis com as especificidades de ligação desejadas (sítios de combinação antígeno-anticorpo) podem ser fundidos com sequências de domínio constante de imunoglobulina. A fusão é de preferência com um domínio constante da cadeia pesada de imunoglobulina, incluindo pelo menos parte das regiões de dobradiça, CH2 e CH3. É preferível ter a primeira região constante de cadeia pesada (CH1) que contém o sítio necessário para ligação de cadeia leve presente em pelo menos uma das fusões. DNAs que codificam as fusões de cadeia pesada de imunoglobulina e, se desejado, a cadeia leve de imunoglobulina, são inseridos em vetores de expressão separados, e são co-transfectados em um organismo hospedeiro adequado. Para mais detalhes de como gerar anticorpos biespecíficos, ver, por exemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acordo com outra abordagem descrita em WO 96/27011, a interface entre um par de moléculas de anticorpos pode ser projetada para maximizar a percentagem de heterodímeros que se recuperaram de cultura de células recombinantes. A interface preferida compreende pelo menos uma parte da região CH3 de um domínio de anticorpos constante. Neste método, uma ou mais pequenas cadeias laterais de aminoácidos da interface

da primeira molécula de anticorpo são substituídas por cadeias laterais maiores (por exemplo, tirosina ou triptofano). "Cavidades" compensatórias de tamanho idêntico ou similar ao da(s) cadeia(s) lateral(is) grande(s) são criadas na interface da segunda molécula de anticorpo, substituindo-se grandes cadeias laterais de aminoácidos por menores (por exemplo, alanina ou treonina). Isto fornece um mecanismo para aumentar o rendimento do heterodímero sobre outros produtos finais indesejados, como homodímeros.

Anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de comprimento inteiro ou fragmentos de anticorpos (por exemplo, anticorpos biespecíficos $F(ab')_2$). Técnicas para gerar anticorpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticorpos têm sido descritos na literatura. Por exemplo, anticorpos biespecíficos podem ser preparados usando ligação química. Brennan *et al.*, Science 229:81 (1985) descreve um procedimento no qual anticorpos intactos são proteoliticamente clivados para gerar fragmentos $F(ab')_2$. Estes fragmentos são reduzidos na presença do agente complexante de ditiol, arsenito de sódio, para estabilizar ditióis vicinais e prevenir a formação de dissulfeto intermolecular. Os fragmentos Fab' gerados são então convertidos em derivados de tionitrobenzoato (TNB). Um dos derivados Fab' -TNB é então reconvertido a Fab' -tiol por redução com mercaptoetilamina e é misturado com uma quantidade equimolar do outro derivado Fab' -TNB para formar o anticorpo biespecífico. Os anticorpos biespecíficos produzidos podem ser usados como agentes para a imobilização seletiva de enzimas.

Além disso, fragmentos Fab' podem ser diretamente recuperados a partir de *E. coli* e quimicamente acoplados para formar anticorpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175:217-225 (1992) descreve a produção de uma molécula de anticorpo biespecífico totalmente humanizado $F(ab')_2$. Cada fragmento Fab' foi secretado separadamente a partir de *E. coli* e submetido ao acoplamento químico direcionado *in vitro* para formar o anticorpo biespecífico. O anticorpo biespecífico assim formado foi capaz de se ligar a células com superexpressão do receptor ErbB2 e células T humanas normais, bem como acionar a atividade lítica de linfócitos citotóxicos huma-

nos contra alvos do tumor de mama humano.

Várias técnicas para fazer e isolar fragmentos de anticorpos bi-específicos diretamente a partir da cultura de células recombinantes também foram descritas. Por exemplo, anticorpos biespecíficos foram produzidos usando de zíperes leucina. Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). Os peptídeos de zíper de leucina das proteínas Fos e Jun foram ligados às porções Fab' de dois anticorpos diferentes por fusão do gene. Os homodímeros de anticorpos foram reduzidos na região da dobradiça para formar monômeros e depois re-oxidados para formar os heterodímeros de anticorpos. Este método também pode ser utilizado para a produção de homodímeros de anticorpos. A tecnologia de "diacorpo" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90:6444-6448 (1993) tem fornecido um mecanismo alternativo para fazer fragmentos de anticorpos biespecíficos. Os fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) por um ligante que é curto demais para permitir o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia. Portanto, os domínios V_H e V_L de um fragmento são forçados a se parearem com os domínios V_L e V_H complementares de outro fragmento, formando assim dois sítios de ligação a antígeno. Outra estratégia para fazer fragmentos de anticorpos biespecíficos pelo uso de dímeros de uma única cadeia Fv (SFV) também foi relatada. Ver, Gruber *et al.*, J. Immunol. 152:5368 (1994).

Anticorpos com mais de duas valências são contemplados. Por exemplo, anticorpos triespecíficos podem ser preparados. Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60 (1991).

Anticorpos biespecíficos exemplares podem se ligar a dois epítopos diferentes, pelo menos um dos quais se origina no antígeno da proteína da invenção. Alternativamente, um braço anti-antigênico de uma molécula de imunoglobulina pode ser combinado com um braço que se liga a uma molécula de disparo em um leucócito, como uma molécula do receptor de células T (por exemplo, CD2, CD3, CD28, ou B7), ou receptores de Fc para IgG (FcγR), como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16) de modo a a

focar os mecanismos de defesa celular na célula que expressa o antígeno particular. Anticorpos biespecíficos também podem ser usados para direcionar agentes citotóxicos para células que expressam um antígeno específico. Estes anticorpos possuem um braço de ligação a antígeno e um braço que
5 se liga a um agente citotóxico ou a um quelante de radionuclídeo, como EO-TUBE, DPTA, DOTA, ou TETA. Outro anticorpo biespecífico de interesse se liga ao antígeno da proteína aqui descrito e ainda se liga ao fator tecidual (TF).

Anticorpos heteroconjugados também estão dentro do escopo
10 da presente invenção. Anticorpos heteroconjugados são compostos de dois anticorpos covalentemente unidos. Esses anticorpos, por exemplo, foram propostos para direcionar células do sistema imunológico a células indesejadas (ver Patente U.S. N°. 4.676.980) e para o tratamento da infecção por HIV (ver WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). É contemplado que os
15 anticorpos podem ser preparados *in vitro* usando métodos conhecidos em química de proteínas sintéticas, incluindo aqueles que envolvem agentes de reticulação. Por exemplo, imunotoxinas podem ser construídas usando uma reação de troca de dissulfeto, ou através da formação de uma ligação tioéter. Exemplos de reagentes adequados para este fim incluem iminotiolato e
20 metil-4-mercaptobutirimidato e aqueles divulgados, por exemplo, na Patente U.S. N°. 4.676.980.

Pode ser desejável modificar o anticorpo da invenção em relação à função efetora, de modo a aumentar, por exemplo, a eficácia do anticorpo no tratamento de doenças e distúrbios associados com a sinalização
25 de IL-17F. Por exemplo, resíduo(s) de cisteína(s) podem ser introduzidos na região Fc, permitindo assim a formação da ligação dissulfeto intercadeias nesta região. O anticorpo homodimérico assim gerado pode ter a capacidade de internalização melhorada e/ou morte de células mediada pelo complemento maior e citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). (Ver
30 Caron *et al.*, J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) e Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)). Alternativamente, pode ser projetado um anticorpo que tem duplas regiões de Fc e pode assim ter lise complementar e capaci-

dades ADCC melhoradas. (Ver Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)).

A invenção também pertence a imunocorjugados que compreendem um anticorpo conjugado a um agente citotóxico, como uma toxina
5 (por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa de bactérias, plantas, fungos, ou de origem animal, ou fragmentos dos mesmos), ou um isótopo radioativo (ou seja, um radioconjugado).

Toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos das mesmas que podem ser usados incluem a cadeia A de difteria, fragmentos ativos de não
10 ligação da toxina da difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas Aleurites fordii, proteínas diantina, proteínas Phytolaca americana (PAPI, PAPII e PAP-S), inibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogellina, restrictocina,
15 fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Uma variedade de radionuclídeos estão disponíveis para a produção de anticorpos radioconjugados. Exemplos incluem ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y e ^{186}Re .

Conjugados do anticorpo e agente citotóxico são feitos usando uma variedade de agentes de acoplamento de proteína bifuncionais, como
20 3-N-succinimidil-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoesters (como dimetil adipimidato HCL), ésteres ativos (como disuccinimidil suberato), aldeídos (como glutarealdeído), compostos bis-azido (como bis p-azidobenzoil) hexanediamina), derivados de bis-diazônio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), di-isocianatos
25 (como tolieno 2,6-di-isocianato) e compostos de bis-ativa de flúor (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina de ricina pode ser preparada como descrito em Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987). Ácido triaminepentaacético carbono-14-rotulado-1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno (MX-DTPA) é um agente quelante exemplar para conjugação
30 de radionuclídeos ao anticorpo. (ver WO94/11026).

Aqueles versados na técnica reconhecerão que uma grande variedade de porções possíveis pode ser acoplada aos anticorpos resultantes

da invenção. (ver, por exemplo, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), cujo conteúdo integral é aqui incorporado por referência).

5 O acoplamento pode ser realizado por qualquer reação química que irá ligar as duas moléculas, contanto que o anticorpo e outra porção retenham suas respectivas atividades. Esta ligação pode incluir muitos mecanismos químicos, para ligação covalente, por exemplo, ligação de afinidade, intercalação, ligação coordenada e complexação. A ligação preferencial é,
10 no entanto, a ligação covalente. A ligação covalente pode ser alcançada tanto pela condensação direta de cadeias laterais existentes, quanto pela incorporação de moléculas de ponte externa. Muitos agentes de ligação bivalentes ou polivalentes são úteis no acoplamento de moléculas de proteína, tais como os anticorpos da presente invenção, a outras moléculas. Por exemplo,
15 agentes de acoplamento representativos podem incluir compostos orgânicos, como tioésteres, carbodi-imidas, ésteres de succinimida, di-isocianatos, glutaraldeído, diazobenzenos e diaminas de hexametileno. Esta lista não se destina a ser exaustiva das diferentes classes de agentes de acoplamento conhecidos na técnica, mas sim, é exemplar dos agentes de acoplamento
20 mais comuns. (ver Killen e Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen *et al.*, Immunological Reviews 62:185-216 (1982); e Vitetta *et al.*, Science 238:1098 (1987).

 Ligantes preferidos são descritos na literatura. (ver, por exemplo, Ramakrishnan, S. *et al.*, Cancer Res. 44:201-208 (1984) que descreve o uso
25 de MBS (M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster). Ver também, Patente U.S. N°. 5.030.719, que descreve o uso de derivados halogenados de acetil hidrazida acoplados a um anticorpo por meio de um ligante de oligopeptídeo. Ligantes particularmente preferidos incluem: (i) EDC (1-etil-3-(3-dimetilamino-propil)cloridrato de carbodi-imida; (ii) SMPT (4 succinimidiloxi-carbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)-tolueno (Pierce Chem. Co., Cat.
30 (21558G); (iii) SPDP (succinimidil-6 [3-(2-piridilditio) propionamido]hexanoato (Pierce Chem. Co., Cat No21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP (sulfosuccinimidil 6

[3-(2-piridilditio)-propionamida] hexanoato (Pierce Chem. Co. Cat. No2165-G); e (v) sulfo-NHS (N-hidroxissulfo-succinimida: Pierce Chem. Co., Cat. No24510), conjugados com EDC.

Os ligantes descritos acima contêm componentes que possuem
 5 atributos diferentes, levando assim a conjugados com diferentes propriedades físico-químicas. Por exemplo, sulfo-ésteres NHS de carboxilatos de alquila são mais estáveis que sulfo-ésteres NHS de carboxilatos aromáticos. Ligantes que contêm NHS-éster são menos solúveis que sulfo-ésteres NHS. Além disso, o ligante SMPT contém uma ligação dissulfeto estericamente
 10 impedida, e pode formar conjugados com maior estabilidade. Ligações dissulfeto são, em geral, menos estáveis do que outras ligações, porque a ligação dissulfeto é clivada *in vitro*, resultando em menos conjugado disponível. Sulfo-NHS, em particular, pode melhorar a estabilidade de acoplamentos de carbodimida. Acoplamentos de carbodimida (como EDC), quando usados
 15 em conjunto com sulfo-NHS, forma ésteres que são mais resistentes à hidrólise do que a reação de acoplamento de carbodimida sozinha.

Os anticorpos divulgados aqui também podem ser formulados como imunolipossomas. Lipossomas contendo o anticorpo são preparados por métodos conhecidos na técnica, como descrito em Epstein *et al.*, Proc.
 20 Natl. Acad. Sci. EUA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. EUA, 77: 4030 (1980); e Pat. U.S. N°s 4.485.045 e 4.544.545. Lipossomas com maior tempo de circulação são divulgados na Patente U.S. N°. 5.013.556.

Lipossomas particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação em fase reversa com uma composição lipídica compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina PEG-derivatizada (PEG-PE). Lipossomas são extrudados através de filtros de tamanho de
 25 poro definido para produzir lipossomas com o diâmetro desejado. Fragmentos Fab' do anticorpo da presente invenção podem ser conjugados com os
 30 lipossomas, conforme descrito em Martin *et al.*, J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) através de uma reação de intercâmbio dissulfeto.

Uso de anticorpos contra IL-17F

Será apreciado que a administração de entidades terapêuticas de acordo com a invenção será realizada com carreadores, excipientes e outros agentes adequados que são incorporados em formulações para fornecer

5 transferência melhorada, distribuição, tolerância e assim por diante. A quantidade de formulações apropriadas pode ser encontrada no formulário conhecido por todos os químicos-farmacêuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), particularmente Capítulo 87, por Blaug, Seymour, nele. Estas formulações incluem,

10 por exemplo, pós, pastas, pomadas, geléias, ceras, óleos, lipídeos, lipídeos (catiônicos ou aniônicos) contendo vesículas (como Lipofectin™), conjugados de DNA, pastas de absorção de anidro, emulsões óleo em água e água em óleo, emulsões carbowax (polietileno glicóis de vários pesos moleculares), géis semissólidos e misturas semissólidas contendo carbowax. Qualquer uma das misturas acima mencionadas pode ser apropriada em tratamentos e terapias de acordo com a presente invenção, desde que o ingrediente ativo na formulação não seja inativado pela formulação e a formulação seja fisiologicamente compatível e tolerável com a via de administração. Ver também Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for

15 preclinical guidance". Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals". Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts". J Pharm Sci.89(8):967-78 (2000), Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J

20 Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) e as citações neles para obter informações adicionais relacionadas a formulações, excipientes e carreadores bem conhecidos dos químicos-farmacêuticos.

Em uma modalidade, os anticorpos da invenção, que incluem um anticorpo monoclonal da invenção (por exemplo, um anticorpo monoclonal totalmente humano), podem ser utilizados como agentes terapêuticos.

30 Estes agentes serão geralmente empregados para diagnosticar, prognosticar, monitorar, tratar, aliviar e/ou prevenir uma doença ou patologia associada.

da à sinalização de IL-17F em um indivíduo. Um esquema terapêutico é realizado através da identificação de um indivíduo, por exemplo, um paciente humano sofrendo de (ou em risco de desenvolver) uma doença inflamatória ou distúrbio, usando métodos padrão. Uma preparação de anticorpos, de preferência com alta especificidade e alta afinidade para seu antígeno alvo, é administrada ao indivíduo e geralmente tem um efeito devido à sua ligação com o alvo. A administração do anticorpo pode revogar, ou inibir, ou interferir com a função de sinalização do alvo (por exemplo, IL-17F). A administração do anticorpo pode revogar, ou inibir, ou interferir com a ligação do alvo (por exemplo, IL-17F) com um ligante endógeno (por exemplo, IL-17R ou IL-17RC) a que se liga naturalmente. Por exemplo, o anticorpo se liga ao alvo e modula, bloqueia, inibe, reduz, antagoniza, neutraliza, ou então interfere com a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-17F-induzida.

Doenças ou distúrbios relacionados à sinalização de IL-17F incluem doenças autoimunes ou doenças inflamatórias ou distúrbios, incluindo, mas não limitado a, artrite reumatoide, doença de Crohn, psoríase, esclerose múltipla, doença pulmonar obstrutiva crônica e asma. IL-17F mostrou ser regulado ascendente na saliva de pacientes com fibrose cística (ver McAllister *et al.*, J. Immunol. 175: 404-412 (2005)) e no cólon de pacientes que sofrem de doença inflamatória intestinal (ver Seiderer *et al.*, Inflamm. Bowel Dis. Dec. 18 2007, Epub. ahead of print). IL-17A/IL-17F mostrou desempenhar um papel no recrutamento de neutrofilia por vias aéreas, sugerindo um papel na patogênese de doenças respiratórias (ver Liang *et al.*, J. Immunol. 179(11): 7791-9 (2007)).

Doenças autoimunes incluem, por exemplo, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS, que é uma doença viral com um componente autoimune), alopecia areata, espondilite anquilosante, síndrome antifosfolípide, doença de Addison autoimune, anemia hemolítica autoimune, hepatite autoimune, doença autoimune do ouvido interno (AIED), síndrome autoimune linfoproliferativa (ALPS), púrpura trombocitopênica autoimune (ATP), doença de Behcet, cardiomiopatia, hepatiformis sprue dermatite-celiaca; síndrome de disfunção da fadiga crônica imune (CFIDS), polineuropatia des-

mielinizante inflamatória crônica (CIPD), pemphigoid cicatricial, doença de aglutinina fria, síndrome de crista, doença de Crohn, doença de Degos, dermatomiosite juvenil, lúpus discoide, crioglobulinemia mista, fibromialgia-fibromiosite, doença de Graves, síndrome de Guillain-Barré, tireoidite de Hashimoto, fibrose pulmonar idiopática, púrpura trombocitopenia idiopática (PTI), nefropatia por IgA, diabetes mellitus insulina-dependente, artrite crônica juvenil (doença de Still), artrite reumatoide juvenil, doença de Ménière, doença mista do tecido conectivo, esclerose múltipla, miastenia gravis, anemia pernicious, poliarterite nodosa, policondrite, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiosite e dermatomiosite, agamaglobulinemia primária, cirrose biliar primária, psoríase, artrite psoriática, fenômenos de Raynaud, síndrome de Reiter, febre reumática, artrite reumatoide, sarcoidose, esclerodermia (esclerose sistêmica progressiva (ESP), também conhecida como esclerose sistêmica (SS)), síndrome de Sjögren, síndrome de stiff-man, lúpus eritematoso sistêmico, arterite de Takayasu, artrite temporal/arterite de células gigantes, colite ulcerativa, uveíte, vitiligo e granulomatose de Wegener.

Doenças inflamatórias incluem, por exemplo, doenças inflamatórias crônicas e agudas. Exemplos de doenças inflamatórias incluem a doença de Alzheimer, asma, alergia atópica, alergia, aterosclerose, asma brônquica, eczema, glomerulonefrite, doença do enxerto versus hospedeiro, anemias hemolíticas, osteoartrite, septicemia, acidente vascular cerebral, transplante de tecidos e órgãos, vasculite, retinopatia diabética e lesão pulmonar induzida por respirador.

IL-17F também mostrou ser regulado ascendentemente pela sinalização de IL-21, sugerindo que os efeitos pró-inflamatórios associados à sinalização de IL-21 são mediados por IL-17F, além de IL-17A e/ou o complexo IL-17F/IL17A (Wei *et al.*, J Biol Chem. 282(48):34605-10 (2007)). Assim, os anticorpos da invenção também são úteis para o diagnóstico, prognose, monitoramento e/ou tratamento de distúrbios e doenças mediadas pela sinalização de IL-21, incluindo, mas não limitado a, distúrbios inflamatórios/autoimunes, como a doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide,

rejeição de transplantes e psoríase.

- Os anticorpos huIL-17F da invenção são úteis no tratamento, melhoramento e atraso do início e/ou progressão, ou reduzir a severidade de uma condição artrítica ou um ou mais sintomas desta. Antes da presente invenção, estudos determinaram que IL-17F desempenhou pouco ou nenhum papel no desenvolvimento e/ou progressão de condições artríticas autoimunes. (ver Ishigame *et al.*, Immunity, vol. 30: 108-119 (2009)). Os experimentos e os dados fornecidos nos exemplos aqui demonstram o resultado inesperado e surpreendente que a modulação, por exemplo, inibição, neutralização ou outro tipo de bloqueio, a expressão e/ou atividade do homodímero de IL-17F, mas não o complexo heterodimérico IL-17A/IL-17F, retardou significativamente a progressão da condição artrítica e reduziu o nível de mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-1 α , MCP-1 e IL-12/IL-23 (p40) na artrite colágeno-induzida, um modelo animal de artrite reumatoide.
- Assim, a invenção inclui métodos de tratamento, melhoramento e atraso do início e/ou progressão, e/ou alívio de um sintoma de uma condição artrítica pela administração a um indivíduo que dele necessite, de um anticorpo huIL-17F da invenção (por exemplo, 5E12, 41B10, 11C5, 21B10, 1F1, 2E12, 5D3, 22F8, 28B11, 41A4 e 43G6) ou um anticorpo que se liga ao mesmo epitopo ou similar, como um anticorpo huIL-17F da invenção. O anticorpo huIL-17F ou anticorpo que se liga ao mesmo epitopo que um anticorpo huIL-17F da invenção é administrado em uma quantidade suficiente para tratar, melhorar, retardar o início, atrasar a progressão e/ou aliviar um ou mais sintomas da condição artrítica. O indivíduo é, por exemplo, um ser humano.
- Em algumas modalidades, a condição artrítica é uma condição artrítica autoimune. Por exemplo, em algumas modalidades, a condição artrítica é a artrite reumatoide.

- Os sintomas associados a distúrbios relacionados com inflamação incluem, por exemplo, inflamação, febre, mal-estar geral, febre, dor, muitas vezes localizada na área inflamada, pulsação rápida, dor nas articulações ou dores (artralgia), respiração rápida ou outros padrões de respiração anormal, calafrios, confusão, desorientação, agitação, tontura, tosse, disp-

néia, infecções pulmonares, insuficiência cardíaca, insuficiência respiratória, edema, ganho de peso, recaídas mucopurulentas, caquexia, chiado, dor de cabeça e sintomas abdominais, como, por exemplo, dor abdominal, diarreia ou constipação. Os sintomas associados a distúrbios relacionados ao sistema imunológico incluem, por exemplo, inflamação, febre, perda de apetite, perda de peso, sintomas abdominais, como, por exemplo, dor abdominal, diarreia ou constipação, dor nas articulações ou dores (artralgia), fadiga, erupções cutâneas, anemia, extrema sensibilidade ao frio (fenômeno de Raynaud), fraqueza muscular, fadiga muscular, alterações na pele ou no tom do tecido, falta de ar ou outros padrões de respiração anormal, dor no peito ou constrição dos músculos do tórax, frequência cardíaca anormal (por exemplo, elevada ou diminuída), sensibilidade à luz, visão embaçada, ou de outra forma anormal e função reduzida dos órgãos.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo da invenção relaciona-se geralmente à quantidade necessária para alcançar um objetivo terapêutico. Como mencionado acima, isso pode ser uma interação de ligação entre o anticorpo e seu antígeno alvo que, em certos casos, interfere com o funcionamento do alvo. A quantidade necessária para ser administrada dependerá da afinidade de ligação do anticorpo para o seu antígeno específico, e dependerá também dependerá da velocidade com que um anticorpo administrado é esgotado do volume livre do outro indivíduo a que é administrado. Intervalos comuns para a dosagem terapeuticamente eficaz de um fragmento de anticorpo ou anticorpo da invenção podem ser, a título de exemplo não limitante, de cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal a cerca de 50 mg/kg de peso corporal. Frequências de dosagem comum podem variar, por exemplo, de duas vezes por dia a uma vez por semana.

A eficácia do tratamento é determinada em associação com qualquer método conhecido para diagnosticar ou tratar o distúrbio inflamatório relacionado em particular. O alívio de um ou mais sintomas do distúrbio inflamatório relacionado indica que o anticorpo confere um benefício clínico.

Métodos para a triagem de anticorpos que possuem a especificidade desejada incluem, mas não estão limitados a, ensaio imunoenzimático

indireto (ELISA) e outras técnicas imunologicamente mediadas conhecidas dentro da técnica.

Em outra modalidade, os anticorpos direcionados contra IL-17F e/ou o complexo IL-17F/IL17A podem ser usados em métodos conhecidos na técnica relacionadas à localização e/ou quantificação de IL-17F ou do complexo IL-17A/IL-17F (por exemplo, para uso na medição dos níveis de IL-17F e/ou do complexo IL-17A/IL-17F dentro de amostras fisiológicas apropriadas, para uso em métodos de diagnóstico, para uso na geração de imagens da proteína e assim por diante). Em uma dada modalidade, anticorpos específicos para IL-17F e/ou o complexo IL-17A/IL-17F, ou derivado, fragmento, análogo, ou homólogo dos mesmos, que contêm o domínio de ligação a antígeno derivado, são utilizados como compostos farmacologicamente ativos (a seguir designada "Terapêutica").

Em outra modalidade, um anticorpo específico para IL-17F e/ou o complexo IL-17A/IL-17F heterodimérico pode ser usado para isolar um polipeptídeo IL-17F e/ou um polipeptídeo do complexo IL-17A/IL-17F heterodimérico por técnicas padrões, como imunoafinidade, cromatografia, ou imunoprecipitação. Anticorpos direcionados contra a proteína IL-17F e/ou o IL-17A heterodimérico/complexo IL-17F (ou um fragmento deste) podem ser usados em diagnóstico para monitorar os níveis de proteína no tecido como parte de um procedimento de teste clínico, por exemplo, para, por exemplo, determinar a eficácia de um dado regime de tratamento. A detecção pode ser facilitada pelo acoplamento (isto é, ligação física) do anticorpo a uma substância detectável. Exemplos de substâncias detectáveis incluem várias enzimas, grupos protéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes e materiais radioativos. Exemplos de enzimas apropriadas incluem peroxidase de raiz-forte, fosfatase alcalina, β -galactosidase, ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupo de próteses adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloreto de dansil, ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescen-

te inclui luminol; exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina e aequorina, e exemplos de material radioativo adequados incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ou ^3H .

- Em outra modalidade um anticorpo de acordo com a invenção
- 5 pode ser usado como um agente para detectar a presença de IL-17F (ou um fragmento de proteína do mesmo) em uma amostra. Em algumas modalidades o anticorpo contém um rótulo detectável. Os anticorpos são policlonais, ou mais preferivelmente, monoclonais. Um anticorpo intacto, ou um fragmento do mesmo (por exemplo, F_{ab} , scFv, ou $F_{(ab)2}$) é usado. O termo "marcado",
 - 10 em relação à sonda ou anticorpo, se destina a abranger a marcação direta da sonda ou anticorpo pelo acoplamento (isto é, ligação física) de uma substância detectável com a sonda ou anticorpo, bem como a marcação indireta da sonda ou anticorpo pela reatividade com outro reagente que está diretamente marcado. Exemplos de marcação indireta incluem a detecção de um
 - 15 anticorpo primário, utilizando um anticorpo secundário marcado com fluorescência e marcação final de uma sonda de DNA com biotina, de modo que pode ser detectado com estreptavidina marcadas com fluorescência. O termo "amostra biológica" destina-se a incluir tecidos, células e fluidos biológicos isolados de um indivíduo, bem como tecidos, células e fluidos presentes
 - 20 em um indivíduo. Incluídos no uso do termo "amostra biológica", portanto, estão sangue e uma fração ou componente do sangue, incluindo soro sanguíneo, plasma sanguíneo, ou linfa. Ou seja, o método de detecção da invenção pode ser usado para detectar um mRNA analito, proteína, ou DNA genômico em uma amostra biológica *in vitro*, assim como *in vivo*. Por exemplo,
 - 25 técnicas *in vitro* para detecção de um mRNA analito incluem hibridizações Northern e *in situ*. Técnicas *in vitro* para detecção de uma proteína de analito incluem ensaios imunoenzimáticos indiretos (ELISAs), *Western blot*, imunoprecipitações e imunofluorescência (ELISAs), *Western blots*, imunoprecipitações e imunofluorescência. Técnicas *in vitro* para a detecção
 - 30 de um DNA genômico de analito incluem hibridizações Southern. Procedimentos para a realização de imunensaaios são descritos, por exemplo, em "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R.

- Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis e T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; e "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Além disso, técnicas *in vivo* para detecção de uma proteína de analito incluem a introdução em um indivíduo de um anticorpo de proteína anti-analito marcado. Por exemplo, o anticorpo pode ser marcado com um marcador radioativo cuja presença e localização em um indivíduo pode ser detectada por técnicas de imagem padrão.

Administração Terapêutica e Formulações de Anticorpos huL-17F

- Os anticorpos da invenção (também referidos aqui como "componentes ativos") e derivados, fragmentos, análogos e homólogos dos mesmos, podem ser incorporados em composições farmacêuticas adequadas para administração. Princípios e considerações envolvidas na preparação destas composições, bem como orientação na escolha dos componentes, são fornecidos, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences: The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, *et al.*, editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement : Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; e Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

- Estas composições geralmente compreendem o anticorpo e um carreador farmacêuticamente aceitável. Onde fragmentos de anticorpos são utilizados, o menor fragmento de inibição que se liga especificamente ao domínio de ligação da proteína-alvo é o preferido. Por exemplo, com base nas sequências de região variável de um anticorpo, podem ser concebidas moléculas de peptídeo que retêm a capacidade de se ligar à sequência da proteína alvo. Estes peptídeos podem ser sintetizados quimicamente e/ou produzidos por tecnologia de DNA recombinante. (Ver, por exemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)).

- Como usado aqui, o termo "carreador farmacêuticamente aceitável" se destina a incluir todos e quaisquer solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e

retardadores de absorção e similares, compatíveis com a administração farmacêutica. Carreadores adequados são descritos na edição mais recente de Remington's Pharmaceutical Sciences, um texto de referência padrão no campo, que é aqui incorporado por referência. Exemplos preferidos destes

5 carreadores ou diluentes incluem, mas não estão limitados a, água, salina, soluções de Ringer, solução de dextrose e 5% de albumina sérica humana. Lipossomas e veículos não aquosos, como óleos fixos, também podem ser usados. O uso destes meios e agentes de substâncias farmacologicamente

10 ou agente convencional é incompatível com o composto ativo, seu uso nas composições é contemplado.

As formulações a serem usadas para administração *in vivo* devem ser estéreis. Isto é facilmente atingido por filtração através de membranas de filtração estéril.

15 Uma composição farmacêutica da invenção é formulada para ser compatível com a sua via pretendida de administração. Exemplos de vias de administração parenteral incluem, por exemplo, administração intravenosa, intradérmica, subcutânea, oral (por exemplo, inalação), transdérmica (isto é, tópica), transmucosa e retal. Soluções ou suspensões usadas para aplica-

20 ção parenteral, intradérmica ou subcutânea podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril, como água para injeção, solução salina, óleos fixos, glicóis de polietileno, glicerina, propilenoglicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos, como álcool benzílico ou metil parabenos; antioxidantes, como ácido ascórbico, ou bissulfito de sódio; agentes quelan-

25 tes, como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA); tampões, como acetatos, citratos, ou fosfatos e agentes para o ajuste de tonicidade, como cloreto de sódio, ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, como o ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parenteral pode ser colocada em ampolas, seringas descartáveis, ou frascos de doses múltiplas

30 feitos de vidro ou de plástico.

Composições farmacêuticas adequadas para uso injetável incluem soluções aquosas estéreis (solúveis em água) ou dispersões e pós esté-

reis para a preparação extemporânea de soluções injetáveis estéreis ou dispersão. Para administração intravenosa, carreadores adequados incluem solução salina fisiológica, água bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) ou tampão fosfato salino (PBS). Em todos os casos, a composição deve ser estéril e deve ser fluida na medida em que houver fácil "seringabilidade". Deve ser estável sob as condições de fabricação e armazenamento e deve ser preservado contra a ação contaminante dos microrganismos, como bactérias e fungos. O carreador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliál (por exemplo, glicérol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido e similares) e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessária no caso de dispersão e pelo uso de surfactantes. A prevenção da ação de microrganismos pode ser alcançada por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal e similares. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois, como manitol, sorbitol e cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser provocada pela inclusão na composição de um agente que retarda a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas através da incorporação do composto ativo na quantidade necessária em um solvente apropriado com um, ou uma combinação, de ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido de esterilização filtrada. Geralmente, as dispersões são preparadas pela incorporação do composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básica e os outros ingredientes necessários daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, métodos de preparação são secagem a vácuo e liofilização, que produz um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução previamente estéril filtrada do mesmo.

Composições orais geralmente incluem um diluente inerte ou um carreador comestível. Elas podem ser colocadas em cápsulas de gelatina ou comprimidas em tabletes. Para efeitos de administração terapêutica oral, o composto ativo pode ser incorporado com excipientes e usado na forma de comprimidos, troches, ou cápsulas. Composições orais também podem ser preparadas usando um carreador fluido para uso como antisséptico bucal, onde o composto no carreador fluido é aplicado por via oral e expectorado ou deglutido. Agentes de ligação farmacêuticamente compatíveis e/ou materiais adjuvantes podem ser incluídos como parte da composição. Os comprimidos, pílulas, cápsulas, troches e similares podem conter qualquer um dos seguintes ingredientes, ou compostos de natureza semelhante: um ligante, como goma de celulose microcristalina, tragacanto ou gelatina; um excipiente, como amido ou lactose, um agente de desintegração, como ácido algínico, Primogel, ou amido de milho; um lubrificante, como estearato de magnésio ou Sterotes; um glidante, como dióxido de silício coloidal; um agente adoçante, como sacarose ou sacarina; ou um agente aromatizante, como hortelã-pimenta, salicilato de metila, ou aromatizantes de laranja.

Para administração por inalação, os compostos são liberados na forma de um aerossol de um recipiente ou dispensador sob pressão que contém um propulsor adequado, por exemplo, um gás, como dióxido de carbono, ou um nebulizador.

A administração sistêmica também pode ser por meio transmucosal ou transdérmica. Para administração transmucosal ou transdérmica, penetrantes apropriados da barreira a ser permeada são utilizados na formulação. Esses penetrantes são geralmente conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, para administração transmucosal, detergentes, sais biliares e derivados do ácido fusídico. A administração em transmucosa pode ser realizada através do uso de sprays nasais ou supositórios. Para a administração transdérmica, os compostos ativos são formulados em pomadas, unguentos, géis, ou cremes geralmente conhecidos na técnica.

Os compostos também podem ser preparados na forma de supositórios (por exemplo, com bases de supositório convencionais, como

manteiga de cacau e outros glicerídeos), ou enemas de retenção para liberação retal.

Em uma modalidade, os compostos ativos são preparados com carreadores que irão proteger o composto contra a rápida eliminação do organismo, como formulações de liberação sustentada/controlada, incluindo implantes e sistemas de liberação microencapsulados. Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis podem ser usados, como acetato de etileno vinil, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Métodos para a preparação destas formulações será evidente para aqueles versados na técnica.

Por exemplo, os ingredientes ativos podem ser presos em microcápsulas preparadas, por exemplo, através de técnicas de coacervação, ou por polimerização interfacial, por exemplo, hidroximetilcelulose, ou microcápsulas de gelatina e microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, em sistemas coloidais de liberação de fármacos (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nano-partículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões.

Preparações de liberação sustentada podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de liberação sustentada incluem matrizes de polímeros sólidos hidrofóbicos semipermeáveis contendo o anticorpo, matrizes que são na forma de artigos, por exemplo, filmes ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil metacrilato), ou poli(vinilalcool)), polilactidas (Pat. U.S. N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutâmico e γ etil-L-glutamato, acetato de etileno vinil não degradável, copolímeros degradáveis de ácido glicólico-ácido láctico, como LUPRON DEPOT™ (microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida) e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Embora polímeros como etileno-vinil acetato e ácido láctico-ácido glicólico permitam a liberação de moléculas por mais de 100 dias, certos hidrogéis liberam proteínas por períodos de tempo mais curtos.

Os materiais também podem ser obtidos comercialmente a partir

de Alza Corporation e Nova Pharmaceuticals, Inc. Suspensões lipossômicas (incluindo lipossomas direcionados a células infectadas com anticorpos monoclonais para antígenos virais) também podem ser utilizadas como carreadores farmacêuticamente aceitáveis. Estes podem ser preparados de acordo com métodos conhecidos daqueles versados na técnica, por exemplo, conforme descrito na Patente U.S. Nº 4.522.811.

É especialmente vantajoso formular composições orais ou parentais em forma de dosagem unitária para o caso de administração e uniformidade de dosagem. A forma de unidade de dosagem conforme usada aqui refere-se às unidades fisicamente discretas para o sujeito a ser tratado; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada do composto ativo calculado para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o transportador farmacêutico exigido. A especificação para as formas de unidade de dosagem da invenção é ditada por e diretamente dependente das características únicas do composto ativo e o efeito terapêutico particular a ser alcançado, e as limitações inerentes na técnica da composição de tal composto ativo para o tratamento de indivíduos.

As composições farmacêuticas podem ser incluídas em um recipiente, pacote ou dispensador junto com instruções para administração.

A formulação também pode conter mais do que um composto ativo, conforme necessário para a indicação particular sendo tratada, de preferência aqueles com atividades complementares que não se afetam de modo adverso entre si. Alternativamente ou adicionalmente, a composição pode compreender um agente que reforça sua função, tal como, por exemplo, um agente citotóxico, citocina, agente quimioterápico ou agente inibidor de crescimento. Essas moléculas estão presentes adequadamente em combinação em quantidades que são eficazes para os fins pretendidos.

Em uma modalidade, os compostos ativos são administrados em terapia de combinação, ou seja, combinado com outros agentes, por exemplo, agentes terapêuticos, que são úteis para o tratamento de condições ou desordens patológicas, tais como desordens autoimunes e doenças inflamatórias. O termo "em combinação" neste contexto significa que os agentes

são dados de modo substancialmente contemporâneo, seja simultaneamente ou sequencialmente. Se dados sequencialmente, no começo da administração do segundo composto, o primeiro dos dois compostos é preferencialmente ainda detectável nas concentrações eficazes no local do tratamento.

5 Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir um ou mais anticorpos da invenção coformulados com, e/ou coadministrados com, um ou mais agentes terapêuticos adicionais, por exemplo, uma ou mais citocinas e inibidores de fator de crescimento, imunossuppressores, agentes anti-inflamatórios, inibidores metabólicos, inibidores de enzima e/ou agentes citotóxicos ou citotásticos, conforme descrito em mais detalhes abaixo. Além
10 disso, um ou mais anticorpos descritos aqui podem ser utilizados em combinação com dois ou mais dos agentes terapêuticos descritos aqui. Tais terapias de combinação podem usar de modo vantajoso dosagens mais baixas dos agentes terapêuticos administrados, evitando, assim, possíveis toxicidades ou complicações associadas com as várias monoterapias.
15

 Agentes terapêuticos preferenciais usados em combinação com um anticorpo da invenção são aqueles agentes que interferem em estágios diferentes em uma resposta inflamatória. Em uma modalidade, um ou mais anticorpos descritos aqui podem ser coformulados com, e/ou coadministrados com, um ou mais agentes adicionais tal como outra citocina ou antagonistas de fator de crescimento (por exemplo, receptores solúveis, inibidores de peptídeos, moléculas pequenas, fusões de ligantes); ou anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam aos outros alvos (por
20 exemplo, anticorpos que se ligam a outras citocinas ou fatores de crescimento, seus receptores ou outras moléculas de superfície celular); e citocinas antiinflamatórias ou seus agonistas. Exemplos não limitadores dos agentes, que podem ser utilizados em combinação com os anticorpos descritos aqui, incluem, mas não estão limitados aos antagonistas de uma ou mais interleucinas (ILs) ou seus receptores, por exemplo, antagonistas de IL-1, IL-2, IL-6,
25 IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21 e IL-22; antagonistas das citocinas ou fatores de crescimento ou seus receptores, tais como fator de necrose tumoral (TNF), LT, EMAP-II, GM-CSF, FGF e PDGF. Anticorpos da
30

- invenção também podem ser combinados com inibidores de, por exemplo, anticorpos para moléculas de superfície celular tais como CD2, CD3, CD4, CD8, CD20 (por exemplo, o rituximab inibidor de CD20 (RITUXAN[®])), CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, ou
- 5 seus ligantes, incluindo CD154 (gp39 ou CD4OL), ou LFA-1/ICAM-1 e VLA-4/VCAM-1 (Yusuf-Makagiansar et al. (2002) *Med. Res. Rev.* 22:146-67). Antagonistas preferenciais que podem ser usados em combinação com os anticorpos descritos aqui incluem antagonistas de IL-1, IL-12, TNF α , IL-15, IL-18, e IL-22.
- 10 Exemplos daqueles agentes incluem antagonistas de IL-12, tais como anticorpos quiméricos, humanizados, humanos ou gerados *in vitro* (ou seus fragmentos de ligação ao antígeno) que se ligam ao IL-12 (preferencialmente IL-12 humano), por exemplo, o anticorpo revelado na WO 00/56772; inibidores do receptor de IL-12, por exemplo, anticorpos para o receptor de
- 15 IL-12 humano e fragmentos solúveis do receptor de IL-12, por exemplo, receptor de IL-12 humano. Exemplos dos antagonistas de IL-15 incluem anticorpos (ou seus fragmentos de ligação ao antígeno) contra IL-15 ou seu receptor, por exemplo, anticorpos quiméricos, humanizados, humanos ou gerados *in vitro* ao IL-15 humano ou seu receptor, fragmentos solúveis do receptor de IL-15 e proteínas de ligação ao IL-15. Exemplos de antagonistas
- 20 de IL-18 incluem os anticorpos, por exemplo, anticorpos quiméricos, humanizados, humanos ou gerados *in vitro* (ou seus fragmentos de ligação ao antígeno) ao IL-18 humano, fragmentos solúveis do receptor de IL-18 e proteínas de ligação de IL-18 (IL-18BP). Exemplos dos antagonistas de IL-1 incluem
- 25 inibidores de enzima que converte a Interleucina 1 (ICE), tais como Vx740, antagonistas de IL-1, por exemplo, IL-IRA (anikinra, KINERET[™], Amgen), sIL1RII (Immunex) e anticorpos de receptor anti-IL-1 (ou seus fragmentos de ligação ao antígeno).
- 30 Exemplos de antagonistas de TNF incluem anticorpos quiméricos, humanizados, humanos ou gerados *in vitro* (ou seus fragmentos de ligação ao antígeno) ao TNF (por exemplo, TNF α humano), tal como (HUMIRA[™], D2E7, anticorpo de TNF α humano), CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356

(anticorpo anti-TNF α humanizado; Celltech/Pharmacia), cA2 (anticorpo anti-TNF α quimérico; REMICADE[®], Centocor); fragmentos de anticorpo anti-TNF (por exemplo, CPD870); fragmentos solúveis dos receptores TNF, por exemplo, receptores de TNF humano p55 ou p75 ou seus derivados, por exemplo, 75 kDTNFR-IgG (75 kD proteína de fusão de IgG de receptor de TNF, ENBREL[™], Immunex), p55 kDTNFR-IgG (proteína de fusão de IgG de receptor de TNF 55 kD (LENERCEPT[®])); antagonistas de enzima, por exemplo, inibidores de enzima que convertem TNF α (TACE) (por exemplo, um derivado de ácido hidroxâmico de alfa-sulfonila e inibidor TACE de N-hidroxiformamida GW 3333, -005 ou -022); e TNF-bp/s-TNFR (proteína de ligação ao TNF solúvel). Antagonistas de TNF preferenciais são fragmentos solúveis dos receptores de TNF, por exemplo, receptores de TNF humano p55 ou p75 ou seus derivados, por exemplo, 75 kDTNFR-IgG e inibidores de enzima conversora de TNF α (TACE).

Em outras modalidades, os anticorpos descritos aqui podem ser administrados em combinação com um ou mais dos seguintes: antagonistas de IL-13, por exemplo, receptores de IL-13 solúvel (sIL-13) e/ou anticorpos contra IL-13; antagonistas de IL-2, por exemplo, DAB 486-IL-2 e/ou DAB 389-IL-2 (proteínas de fusão de IL-2, Seragen), e/ou anticorpos para IL-2R, por exemplo, anti-Tac (anti-IL-2R humanizado, Protein Design Labs). Ainda outra combinação inclui anticorpos da invenção, moléculas pequenas antagonistas e/ou anticorpos inibitórios em combinação com inibidores anti-CD4 não depletos (DEC-CE9.1/SB 210396; anticorpo anti-CD4 primatizado não depletor; IDEC/SmithKline). Ainda, outras combinações preferenciais incluem antagonistas da via coestimulatória CD80 (B7.1) ou CD86 (B7.2), incluindo anticorpos, receptores solúveis ou ligantes antagonistas; bem como glicoproteína ligante da p-selectina (PSGL), citocinas antiinflamatórias, por exemplo, IL-4 (DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; DNAX de IL-10 recombinante/Schering); IL-13 e TGF- β , e seus agonistas (por exemplo, anticorpos de agonistas).

Em outras modalidades, um ou mais anticorpos da invenção podem ser coformulados com; e/ou coadministrados com, uma ou mais drogas

antiinflamatórias, imunossuppressores ou inibidores metabólicos ou enzimáticos. Exemplos não limitativos das drogas ou inibidores, que podem ser usados em combinação com os anticorpos descritos aqui, incluem, mas não estão limitados a uma ou mais da: droga(s) antiinflamatória não esteroidal (NSAIDs), por exemplo, ibuprofeno, tenidap, naproxeno, meloxicam, piroxicam, diclofenaco e indometacina; sulfasalazina; corticoesteroides tais como prednisolona; droga(s) antiinflamatória supressiva de citocina (CSAIDs); inibidores de biosíntese de nucleotídeo, por exemplo, inibidores de biosíntese de purina, antagonistas de folato (por exemplo, metotrexato (ácido N-[4-
 5
 10
 15
 20
 25
 30

Exemplos de inibidores adicionais incluem um ou mais dos: corticoesteroides (oral, inalado ou injeção local); imunossuppressores, por exemplo, ciclosporina, tacrolimus (FK-506); e inibidores de mTOR, por exemplo, sirolimus (rapamicina – RAPAMUNE™ ou derivados de rapamicina, por exemplo, derivados de rapamicina solúvel (por exemplo, derivados de éster de rapamicina, por exemplo, CCI-779); agentes que interferem com sinalização por citocinas pró-inflamatórias tais como TNFα ou IL-1 (por exemplo, IRAK, NIK, IKK, p38 ou inibidores de MAP quinase); inibidores de COX2, por exemplo, celecoxib, rofecoxib e seus variantes; inibidores de fosfodiesterase, por exemplo, R973401 (inibidor de fosfodiesterase do Tipo IV); inibidores de fosfolipase, por exemplo, inibidores de fosfolipase 2 citosólica (cPLA2) (por exemplo, análogos de trifluorometil cetona); inibidores do fator de crescimento celular endotelial vascular ou receptor de fator de crescimento, por exemplo, inibidor de VEGF e/ou inibidor de VEGF-R; e inibidores de angiogênese. São agentes terapêuticos preferenciais para uso em combinação com os anticorpos da invenção os imunossuppressores, por exemplo, ciclosporina, tacrolimus (FK-506); inibidores de mTOR, por exemplo, sirolimus (rapamicina)

ou derivados de rapamicina, por exemplo, derivados de rapamicina solúvel (por exemplo, derivados de éster de rapamicina, por exemplo, CCI-779); inibidores de COX2, por exemplo, celecoxib e suas variantes; e inibidores de fosfolipase, por exemplo, inibidores de fosfolipase 2 citosólica (cPLA2), por exemplo, análogos de trifluorometil cetona.

Exemplos adicionais dos agentes terapêuticos que podem ser combinados com um anticorpo da invenção incluem uma ou mais da: 6-mercaptopurinas (6-MP); azatioprina sulfasalazina; mesalazina; olsalazina; cloroquina/ hidroxiclороquina (PLAQUENIL®); pencillamina; aurotiornalato (intramuscular e oral); azatioprina; coichicina; agonista de beta-2 adrenorreceptor (salbutamol, terbutalina, salmeteral); xantinas (teofilina, aminofilina); cromoglicato; nedocromil; cetotifeno; ipratrópio e oxitrópio; mofetil micofenolato; agonistas de adenosina; agentes antitrombóticos; inibidores complementares; e agentes adrenérgicos.

Exemplos não limitativos de agentes para tratamento ou prevenção de distúrbios artríticos (por exemplo, artrite reumatoide, artrite inflamatória, artrite reumatoide, artrite reumatoide juvenil, osteoartrite e artrite psoriática), com os quais um anticorpo da invenção pode ser combinado inclui um ou mais dos seguintes: antagonistas de IL-12 conforme descrito aqui, NSAIDs; CSAIDs; antagonistas de TNFs, por exemplo, TNF α , conforme descrito aqui; anticorpos anti-CD4 não depletadores como descritos aqui; antagonistas de IL-2 conforme descrito aqui; citocinas antiinflamatórias, por exemplo, IL-4, IL-10, IL-13 e TGF α , ou seus agonistas; antagonistas de receptor de IL-1 ou IL-1 conforme descrito aqui; inibidores de fosfodiesterase conforme descrito aqui; inibidores de Cox-2 conforme descrito aqui; iloprost; metotrexato; talidomida e drogas relacionadas à talidomida (por exemplo, Celgen); leflunomida; inibidor de ativação de plasminogeno, por exemplo, ácido tranexâmico; inibidor de citocina, por exemplo, T-614; prostaglandina E1; azatioprina; um inibidor da enzima conversora de interleucina-1 (ICE); zap-70 e/ou inibidor de lck (inibidor da tirosina quinase zap-70 ou lck); um inibidor do fator de crescimento celular endotelial vascular ou receptor de crescimento celular endotelial vascular conforme descrito aqui; um inibidor de

angiogênese conforme descrito aqui; drogas antiinflamatórias de corticosteroide (por exemplo, SB203580); inibidores da convertase TNF; IL-11; IL-13; inibidores de IL-17; ouro; penicillamina; cloroquina; hidroxicloroquina; clorambucil; ciclofosfamida; ciclosporina; irradiação de linfóide total; globulina antitimócito; toxinas CD5; peptídeos administrados oralmente e colágeno; lobenzarit disódio; agentes reguladores de citocina (CRAs) HP228 e HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); oligodeoxinucleotídeos fósforotioato anti-sensível à ICAM-1/ ICAM-1 antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor 1 complementar solúvel (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednisona; orgoteína; polisulfato de glicosaminoglicano; minociclina (MINOCIN®); anticorpos anti-IL2R; lipídeos marinhos e botânicos (ácidos graxos e peixe e de semente de planta); auranofm; fenilbutazona; ácido meclofenâmico; ácido flufenâmico; globulina imune intravenosa; zileuton; ácido micofenólico (RS-61443); tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamicina); amiprilose (terafectina); cladribina (2-clorodeóxiadenosina); e azaribina. Combinações preferenciais incluem um ou mais anticorpos da invenção em combinação com metotrexato ou leflunomida, e em casos de artrite reumatoide moderada ou severa, ciclosporina.

Exemplos preferenciais dos inibidores para usar em combinação com anticorpos da invenção para tratar distúrbios artríticos incluem antagonistas de TNF (por exemplo, anticorpos quiméricos, humanizados, humanos ou gerados *in vitro* ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, que se ligam ao TNF; fragmentos solúveis de um receptor de TNF, por exemplo, receptor de TNF humano p55 ou p75 ou seus derivados, por exemplo, 75 kDTNFR-IgG (proteína de fusão de IgG de receptor de TNF 75kD, ENBREL™), proteína de fusão de IgG de receptor de TNF p55; antagonistas de enzima TNF, por exemplo, inibidores de enzima conversora de TNF α (TACE)); antagonistas de IL-12, IL-15, IL-18, IL-22; agentes de depleção de células T e B (por exemplo, anticorpos anti-CD4 ou anti-CD22); inibidores de moléculas pequenas, por exemplo, metotrexato e leflunomida; sirolimus (rapamicina) e seus análogos, por exemplo, inibidores de CCI-779; cox-2 e cPLA2; NSAIDs; inibidores de p38, TPL-2, inibidores de Mk-2 e NF κ b; RAGE ou RAGE solú-

vel; inibidores de P-selectina ou PSGL-1 (por exemplo, inibidores de moléculas pequenas, anticorpos neles, por exemplo, anticorpos para P-selectina); agonistas de beta receptor de estrógeno (ERB) ou antagonistas de ERB-NFkb. Agentes terapêuticos adicionais mais preferenciais que podem ser

5 coadministrados e/ou coformulados com um ou mais anticorpos da invenção incluem um ou mais de um fragmento solúvel de um receptor de TNF, por exemplo, receptor de TNF humano p55 ou p75 ou seus derivados, por exemplo, 75 kDTNFR-IgG (proteína de fusão de IgG de receptor de TNK 75kD/75 kD TNF receptor-IgG fusion protein, ENBREL™); metotrexato, leflunomida ou um sirolimus (rapamicina) ou um análogo seu, por exemplo, CCI-779.

Exemplos não limitativos dos agentes para tratamento ou prevenção de esclerose múltipla que podem ser combinados com anticorpos da invenção incluem as seguintes: interferonas, por exemplo, interferona-alfa la

15 (por exemplo, AVONEX™; Biogen) e interferona-lb (BETASERON™ Chiron/Berlex); Copolímero 1 (Cop-1; COPAXONE™ Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxigênio hiperbárico; imunoglobina intravenosa; cladribina; antagonistas de TNF conforme descrito aqui; corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; ciclosporina A,

20 metotrexato; 4- aminopiridina; e tizanidina. Antagonistas adicionais que podem ser usados em combinação com anticorpos da invenção incluem anticorpos para ou antagonistas de outras citocinas humanas ou fatores de crescimento, por exemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, EL-7, IL-8, IL-12 IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-11, GM-CSF, FGF e PDGF. Anticorpos conforme descritos aqui podem ser combinados com anticorpos para moléculas de superfícies celulares tais como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 ou seus ligantes. Os anticorpos da invenção também podem ser combinados com agentes, tais como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, mofetil micofenolato, leflunomida, NSAIDs,

25 por exemplo, ibuprofeno, corticosteroides tais como prednisolona, inibidores de fosfodiesterase, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inibidores complementares, agentes adrenérgicos, agentes que interferem com si-

30

nalização por citocinas pró-inflamatórias conforme descrito aqui, inibidores de enzima conversora de IL-1b (por exemplo, Vx740), anti-P7s, PSGL, inibidores de TACE, inibidores de sinalização de células T tais como inibidores de quinase, inibidores de metaloproteinase, sulfasalazina, azatloprina, 6-mercaptopurinas, inibidores de enzima conversora de angiotensina, receptores de citocina solúvel e seus derivados, conforme descrito aqui e citocinas antiinflamatórias (por exemplo, IL-4, IL-10, IL-13 e TGF).

Exemplos preferenciais de agentes terapêuticos para esclerose múltipla com os quais os anticorpos da invenção podem ser combinados incluem interferona- β , por exemplo, IFN β -1a e IFN β -1b; copaxona, corticosteroides, inibidores de IL-1, inibidores de TNF, anticorpos para o ligante CD40 e CD80, antagonistas de IL-12.

Exemplos não limitativos de agentes para tratamento ou prevenção de doença inflamatória intestinal (por exemplo, doença de Crohn, colite ulcerativa) com o qual um anticorpo da invenção pode ser combinado inclui os seguintes: budenosídeo; fator de crescimento epidérmico; corticosteroides; ciclosporina; sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatloprina; metronidazol; inibidores de lipoxigenase; mesalamina; olsalazina; balsalazídeo; antioxidantes; inibidores de tromboxano; antagonistas de receptor de IL-1; anticorpos monoclonais anti-IL-1; anticorpos monoclonais anti-IL-6; fatores de crescimento; inibidores de elastase; compostos piridinil-imidazol; antagonistas de TNF conforme descrito aqui; IL-4, IL-10, IL-13 e/ou citocinas de TGF β ou seus agonistas (por exemplo, anticorpos de agonistas); IL-11; pró-drogas de conjugado de dextrano ou glucuronídeo da prednisolona, dexametasona ou budesonídeo; oligodeóxinucleotídeos fósforotioato anti-sensível ao ICAM-1/ICAM-1 antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor 1 complementar solúvel (TP10; T Cell Sciences, Inc.); mesalazina de liberação vagarosa; metotrexato; antagonistas do fator ativador de plaquetas (PAF); ciprofloxacina; e lignocaína.

Exemplos não limitativos dos agentes para tratamento ou prevenção de psoríase com os quais um anticorpo da invenção pode ser com-

binado incluem os seguintes: corticosteroides; vitamina D₃ e seus análogos, retinoides (por exemplo, soriatano), metotrexato; ciclosporina, 6-tioguanina; Acutano, hidréia; hidroxiuréia, sulfasalazina; mofetil micofenolato; azatioprina, tacrolimus; ésteres de ácido fumárico; biológicos tais como Amevive, Enbrel, Humira, Raptiva e Remicade, Ustekinmab, e XP-828L; fototerapia; e fotoquimioterapia (por exemplo, psoraleno e fototerapia ultravioleta combinada).

Exemplos não limitativos dos agentes para tratamento ou prevenção de doença de inflamatória das vias aéreas/respiratórias (por exemplo, distúrbio pulmonar obstrutivo crônico, asma) com o qual um anticorpo da invenção pode ser combinado incluem o seguinte: agonistas de beta2-adrenorreceptor (por exemplo, salbutamol (albuterol USAN), levalbuterol, terbutalina, bitolterol); agonistas de beta2-adrenorreceptor de longa duração (por exemplo, salmeterol, formoterol, bambuterol); agonistas adrenérgicos (por exemplo, epinefrina inalada e comprimidos de efedrina); medicações anticolinérgicas (por exemplo, brometo de ipratrópio); combinações de esteroides inalados e broncodilatadores de longa duração (por exemplo, fluticasona/salmeterol (Advair nos Estados Unidos, e Seretide no Reino Unido)) ou. budesonida/formoterol (Symbicort)); glicocorticoides inalatórios (por exemplo, ciclesonida, beclometasona, budesonida, flunisolida, fluticasona, mometasona, triancinolona); modificadores de leucotrienos (por exemplo, montelucaste, zafirlucaste, pranlucaste e zileuton); estabilizadores de células mastos (por exemplo, cromoglicato (cromolina), e nedocromil); antimuscarínicos/anticolinérgicos (por exemplo, ipratrópio, oxitrópio, tiotrópio); metilxantinas (por exemplo, teofilina, aminofilina); anti-histamínicos, bloqueadores de IgE (por exemplo, Omalizumab); antagonistas muscarínicos M₃ (anticolinérgicos) (por exemplo, de ipratrópio, tiotrópio); cromonas (por exemplo, cromoglicato, nedocromila); zantinas (por exemplo, teofilina) e antagonistas de TNF (por exemplo, infliximab, adalimumab e etanercept).

Em uma modalidade, um anticorpo da invenção pode ser usado em combinação com um ou mais anticorpos dirigidos a outros alvos envolvidos na regulação de respostas imunes, por exemplo, a rejeição de transplan-

tes.

Exemplos não limitativos de agentes para o tratamento ou prevenção de respostas imunes com os quais um anticorpo da invenção pode ser combinado incluem os seguintes: anticorpos contra outras moléculas de superfície celular, incluindo, mas não limitados a CD25 (receptor a de interleucina-2), CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4 (CD80 (B7.1), por exemplo, CTLA4 Ig - abatacept (ORENCIA®)), ICOSL, ICOS e/ou CD86 (B7.2). Ainda em outra modalidade, um anticorpo da invenção é usado em combinação com um ou mais agentes imunossuppressores gerais, tais como ciclosporina A ou FK506.

Em outras modalidades, os anticorpos são usados como adjuvantes de vacinas contra desordens autoimunes, doenças inflamatórias e etc. A combinação de adjuvantes para o tratamento desses tipos de desordens são adequadas para uso em combinação com uma ampla variedade de antígenos a partir de autoantígenos alvejados, ou seja, autoantígenos, envolvidos na autoimunidade, por exemplo, proteína básica da mielina; autoantígenos inflamatórios, por exemplo, proteína de peptídeo amiloide ou antígenos de transplante, por exemplo, aloantígenos. O antígeno pode compreender peptídeos ou polipeptídeos derivados de proteínas, bem como fragmentos de qualquer um dos seguintes: sacarídeos, proteínas, polinucleotídeos ou oligonucleotídeos, autoantígenos, proteína de peptídeo amiloide, antígenos de transplante, alergenos ou outros componentes macromoleculares. Em alguns casos, mais de um antígeno está incluído na composição antigênica.

Por exemplo, vacinas desejáveis para moderação de respostas aos alergenos em um hospedeiro vertebrado, que contêm as combinações adjuvantes desta invenção, incluem aquelas que contêm um alergeno ou seu fragmento. Exemplos de tais alergenos são descritos na Patente US No. 5.830.877 e publicados no Pedido de Patente Internacional No. WO 99/51259, que estão incorporados aqui por referência em suas totalidades e incluem pólen, venenos de insetos, pêlos de animais, esporos de fungos e drogas (tais como a penicilina). As vacinas interferem na produção de anti-

corpos IgE, uma causa conhecida de reações alérgicas. Em outro exemplo, vacinas desejáveis para prevenir ou tratar doença caracterizada pela deposição de amiloide em um hospedeiro vertebrado, que contêm as combinações adjuvantes desta invenção, incluem aquelas porções contendo proteína de peptídeo amiloide (APP). Esta doença é referida por vários como a doença de Alzheimer, amiloidose ou doença amiloidogênica. Assim, as vacinas da presente invenção incluem as combinações adjuvantes desta invenção mais peptídeo A β , bem como fragmentos de peptídeo A β e anticorpos para o peptídeo A β ou seus fragmentos.

10 **Desenho e Geração de Outros Terapêuticos**

De acordo com a presente invenção e com base na atividade dos anticorpos que são produzidos e caracterizados aqui com relação a IL-17F e/ou o complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico, o desenho de outras modalidades terapêuticas para além das frações de anticorpos é facilitada.

15 Tais modalidades incluem, sem limitação, terapêuticos de anticorpos avançados, tais como anticorpos biespecíficos, imunotoxinas e terapêuticos rotulados por radio, geração de terapêuticos de peptídeo, terapias gênicas, particularmente intra-corpos, terapêuticos antissenso e moléculas pequenas.

Por exemplo, em conexão com anticorpos biespecíficos, os anticorpos biespecíficos podem ser gerados que compreendem (i) dois anticorpos; um com uma especificidade de IL-17F e/ou o complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico e outro para uma segunda molécula que está conjugada em conjunto, (ii) um anticorpo único que possui uma cadeia específica para IL-17F e/ou o complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico e uma segunda cadeia específica para uma segunda molécula; ou (iii) um anticorpo de cadeia única que possui a especificidade para IL-17F e/ou o complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico e uma segunda molécula. Tais anticorpos biespecíficos são gerados usando técnicas que são bem conhecidas, por exemplo, em conexão com (i) e (ii) Ver, por exemplo, Fanger *et al.* Immunol Methods 4:72-81 (1994) e Wright *et al.* Crit. Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992), e em conexão com (iii) Ver, por exemplo, Traunecker *et al.* Int. J. Cancer (Supl.) 7:51-52 (1992).

Em conexão com imunotoxinas, os anticorpos podem ser modificados para agir como imunotoxinas utilizando técnicas que são bem conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Vitetta *Immunol Today* 14:252 (1993). Ver também Patente U. S. No. 5.194.594. Em conexão com a preparação de anticorpos rotulados por radio, tais anticorpos modificados também podem ser facilmente preparados utilizando técnicas que são bem conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Junghans *et al.* em *Câncer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2ª edição, Chafner e Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). Ver também as Patentes US nºs 4.681.581, 4.735.210, 5.101.827, 5.102.990 (RE 35.500), 5.648.471 e 5.697.902. Cada uma das imunotoxinas e moléculas rotuladas por radio seriam prováveis para matarem as células que expressam IL-17F e/ou do complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico.

Em conexão com a geração de peptídeos terapêuticos, através da utilização de informações estruturais relacionadas ao IL-17F e/ou o complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico e anticorpos do mesmo, tais como os anticorpos da invenção ou seleção das bibliotecas de peptídeo, os peptídeos terapêuticos podem ser gerados, que são dirigidos contra IL-17F e/ou o complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico. O desenho e a seleção de terapêuticos de peptídeo são discutidos em conexão com Houghten *et al.* *Biotechniques* 13:412-421 (1992), Houghten *PNAS EUA* 82:5131-5135 (1985), Pinalla *et al.* *Biotechniques* 13:901-905 (1992), Blake e Litzi-Davis *Bioconjugate Chem.* 3:510-513 (1992). Imunotoxinas e moléculas rotuladas por radio também podem ser preparadas, e de uma forma similar, em conexão com frações peptídicas conforme discutido acima em conexão com anticorpos. Assumindo que o IL-17F e/ou a molécula do complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico (ou uma forma, tal como uma variante de emenda/splice ou forma alternativa) é funcionalmente ativa em um processo de doença, também será possível desenhar terapêuticos genéticos e antissenso aos mesmos através de técnicas convencionais. Tais modalidades podem ser utilizadas para modular a função de IL-17F e/ou o complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico. Em conexão com eles os anticorpos da presente invenção facilitam o desenho e uso dos ensaios funcionais relacionados a estes. Um de-

- senho e uma estratégia para terapêuticos antissenso são discutidos em detalhes no pedido internacional de Patente No. WO 94/29444. O desenho e estratégias para a terapia genética são bem conhecidos. No entanto, em particular, o uso de técnicas terapêuticas que envolvem intracópos poderia
- 5 revelar-se particularmente vantajoso. Veja, por exemplo, Chen *et al.* Human Gene Therapy 5:595-601 (1994) e Marasco Gene Therapy 4:11-15 (1997). O desenho geral e considerações relacionadas com a terapêutica genética também são discutidos no Pedido Internacional de Patente No. WO 97/38137.
- 10 O conhecimento adquirido a partir da estrutura de IL-17F e/ou da molécula do complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico e suas interações com outras moléculas de acordo com a presente invenção, tais como os anticópos da invenção e outros, pode mser utilizados para desenhar racionalmente modalidades terapêuticas adicionais. Neste senso, as técnicas de de-
- 15 senho de drogas racionais, tais como cristalografia por raios X, modelagem molecular auxiliada por computador (ou assistida) (CAMM), relação estrutura-atividade quantitativa ou qualitativa (QSAR) e tecnologias similares podem ser utilizadas para concentrar os esforços de descoberta de drogas. Desenho racional permite a previsão de proteína ou estruturas sintéticas que
- 20 podem interagir com a molécula ou suas formas específicas, que podem ser usadas para modificar ou modular a atividade de IL-17F e/ou do complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico. Tais estruturas podem ser sintetizadas quimicamente ou expressas em sistemas biológicos. Esta abordagem foi revisada em Capsey *et al.* Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs
- 25 (Stockton Press, NY (1988)). Além disso, bibliotecas combinatórias podem ser desenhadas e sintetizadas e usadas em programas de seleção, tais como os esforços de seleção de alto rendimento.

Métodos de seleção

- 30 A invenção fornece métodos (também referidos aqui como "testes de seleção") para a identificação de moduladores, ou seja, compostos candidato ou de teste ou agentes (por exemplo, peptídeos, peptidomiméticos, moléculas pequenas ou outras drogas) que modulam, bloqueiam, ini-

5 bem, reduzem, antagonizam, neutralizam ou interferem de outro modo na
ligação de IL-17F e/ou do complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico aos
seus receptores inatos, ou compostos candidato ou de teste ou agentes que
modulam, bloqueiam, inibem, reduzem, antagonizam, neutralizam ou interfe-
rem de algum outro modo na função de sinalização de IL-17F e/ou do com-
10 plexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico. Também são fornecidos métodos de
identificação de compostos úteis para tratar desordens associadas com IL-
17F e/ou sinalização do complexo IL-17A/IL-17F heterodimérico. A invenção
também inclui compostos identificados nos ensaios de seleção descritos a-
qui.

15 Em uma modalidade, a invenção fornece ensaios para os com-
postos candidatos de seleção ou de teste que modulam a função de sinali-
zação de IL-17F e/ou o complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico. Os com-
postos de teste da invenção podem ser obtidos utilizando qualquer uma das
várias abordagens em métodos de biblioteca combinatória conhecidos na
técnica, incluindo: bibliotecas biológicas; fase sólida paralela espacialmente
endereçável ou bibliotecas de fase de solução; métodos de biblioteca sintéti-
cos exigindo deconvolução, o método de biblioteca "one-counta one-
20 compound", e métodos de biblioteca sintéticos usando seleção por cromato-
grafia de afinidade. A abordagem da biblioteca biológica está limitada às bi-
bliotecas de peptídeo, enquanto que outras quatro abordagens são aplicá-
veis ao peptídeo, oligômero de não peptídeo ou bibliotecas de moléculas
pequenas dos compostos. (Ver, por exemplo, Lam, 1997. Anticancer Drug
Design 12:145).

25 Uma "molécula pequena", como utilizado aqui, é para se referir a
uma composição que tem um peso molecular de menos do que cerca de 5
kD e mais preferencialmente menos do que cerca de 4 kD. Moléculas pe-
quenas podem ser, por exemplo, ácidos nucleicos, peptídeos, polipeptídeos,
peptidomiméticos, carboidratos, lipídios ou outras moléculas orgânicas ou
30 inorgânicas. Bibliotecas de misturas químicas e/ou biológicas, tais como fun-
gos, bactérias ou extratos de algas, são conhecidos na técnica e podem ser
selecionados com qualquer um dos ensaios da invenção.

Exemplos de métodos para a síntese de bibliotecas moleculares podem ser encontrados na técnica, por exemplo, em: DeWitt, et al., 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909; Erb, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 11422; Zuckermann, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 2678; 5 Cho, et al., 1993. Science 261: 1303; Carrell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carell, et al., 1994. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; and Gallop, et al., 1994. J. Med. Chem. 37: 1233. .

Bibliotecas dos compostos podem ser apresentadas em solução (ver, por exemplo, Houghten, 1992, Biotécnicas 13: 412-421), ou em esfe- 10 ras/contas (ver Lam, 1991 Nature 354:82-84), em fatias/chips (ver Fodor, 1993 Nature 364: 555-556), bactérias (veja Patente US No. 5.223.409), esporos (ver Patente US 5.233.409), plasmídeos (ver Cull, et al, 1992 Proc Natl Acad Sci EUA 89: 1865-1869) ou em fago (ver Scott e Smith, 1990 Science 249: 386-390; Devlin, 1990 Science 249: 404-406; Cwirla, et al, 1990 Proc 15 Natl Acad Sci EUA 87: 6378-6382; Felici, 1991 J. Mol Biol 222: 301-310; e Patente U.S. nº 5.233.409).

Em uma modalidade, um composto candidato é introduzido a um complexo antígeno-anticorpo e determinando se o composto candidato interrompe o complexo antígeno-anticorpo, em que uma interrupção deste com- 20 plexo indica que o composto candidato modula a função de sinalização de IL-17F e/ou do complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico. Por exemplo, o anticorpo é anticorpo monoclonal 5E12 ("Mab05") e o antígeno é IL-17F e/ou o complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico.

Em outra modalidade, o homodímero de IL-17F é fornecido e 25 exposto a pelo menos um anticorpo monoclonal neutralizante. A formação de um complexo antígeno-anticorpo é detectada e um ou mais compostos candidatos são apresentados ao complexo. Se o complexo antígeno-anticorpo é interrompido após a introdução de um ou mais compostos candidatos, o composto candidato é útil para tratar desordens associadas com a 30 sinalização de IL-17F.

Em outra modalidade, uma proteína solúvel de IL-17F é fornecida e exposta a pelo menos um anticorpo monoclonal neutralizante. A forma-

ção de um complexo de antígeno-anticorpo é detectada, e um ou mais compostos candidatos são apresentados ao complexo. Se o complexo antígeno-anticorpo é interrompido após a introdução de um ou mais compostos candidatos, o composto candidato é útil para tratar desordens associadas a sinalização de IL-17F.

5 A determinação da capacidade do composto de teste para interferir com ou interromper o complexo antígeno-anticorpo pode ser realizada, por exemplo, pelo acoplamento do composto de teste com um radioisótopo ou rótulo enzimático tais que a ligação do composto de teste ao antígeno ou
10 sua porção biologicamente ativa possa ser determinada pela detecção do composto rotulado em um complexo. Por exemplo, compostos de teste podem ser rotulados com ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C ou ^3H , seja direta ou indiretamente, e os radioisótopos detectados pela contagem direta da emissão de rádio ou por contagem de cintilação. Alternativamente, compostos de teste podem ser
15 rotulados enzimaticamente, com, por exemplo, peroxidase de raiz forte, fosfatase alcalina ou luciferase, e o rótulo enzimático detectado por determinação de conversão de um substrato adequado para o produto.

Em uma modalidade, o ensaio compreende entrar em contato com um complexo antígeno-anticorpo com um composto de teste e determi-
20 nar a capacidade do composto de teste de interagir com o antígeno ou de outra forma interromper o complexo antígeno-anticorpo existente. Nesta modalidade, a determinação da capacidade do composto de teste para interagir com o antígeno e/ou interromper o complexo antígeno-anticorpo compreende a determinação da capacidade do composto de teste para se ligar preferencialmente ao antígeno ou uma sua porção biologicamente ativa, em com-
25 paração com o anticorpo.

Em outra modalidade, o ensaio compreende entrar em contato com um complexo antígeno-anticorpo com um composto de teste e determinar a capacidade do composto de teste para modular o complexo antígeno-anticorpo. A determinação da capacidade do composto de teste para modular o complexo antígeno-anticorpo pode ser realizada, por exemplo, pela de-
30 terminação da capacidade do antígeno para ligar ou interagir com o anticorpo.

po, na presença do composto de teste.

Aqueles versados na técnica reconhecerão que, em qualquer um dos métodos de seleção revelados neste documento, o anticorpo pode ser um anticorpo neutralizante, como por exemplo, o anticorpo monoclonal 5 5E12, 41B10, 11C5, 21B10, 1F1, 2E12, 5D3, 22F8, 28B11, 41A4 e 43G6, cada qual modula ou interfere de outro modo com a produção de citocina pró-inflamatória.

Os métodos de seleção revelados neste documento podem ser realizados como um ensaio baseado em célula ou como um ensaio livre de 10 célula. Os ensaios livres de células da invenção são submissos para uso de IL-17F solúvel, complexo de IL-17A/IL-17F solúvel e seus fragmentos.

Em mais do que uma modalidade, pode ser desejável imobilizar ou o anticorpo ou o antígeno para facilitar a separação da forma complexada da forma não complexada de um ou ambos após a introdução do composto 15 candidato, bem como para acomodar a automação do ensaio. A observação do complexo antígeno-anticorpo na presença e ausência de um composto candidato pode ser realizada em qualquer recipiente adequado para conter os reagentes. Exemplos de tais recipientes incluem placas de microtitulação, tubos de ensaio e tubos de micro-centrifuga. Em uma modalidade, uma pro- 20 teína de fusão pode ser fornecida desde que acrescente um domínio que permita que uma ou ambas as proteínas seja ligada a uma matriz. Por exemplo, as proteínas de fusão de anticorpo GST ou proteínas de fusão de antígeno de GST podem ser adsorvidas em esferas/contas de glutathione se- farose (Sigma Chemical, St. Louis, MO) ou placas de microtitulação derivati- 25 zadas de glutathione, que são então combinadas, então, com o composto de teste e a mistura é incubada sob condições propícias à formação de comple- xos (por exemplo, em condições fisiológicas de sal e pH). Após a incubação, as esferas/contas ou poços da placa de microtitulação são lavadas para re- mover quaisquer componentes não ligados, a matriz imobilizada no caso das 30 esferas/contas, complexo determinado direta ou indiretamente. Alternativa- mente, os complexos podem ser dissociados da matriz, e o nível de forma- ção do complexo antígeno-anticorpo pode ser determinado usando técnicas

padrão.

Outras técnicas para imobilização de proteínas em matrizes também podem ser usadas nos testes de seleção da invenção. Por exemplo, tanto o anticorpo (por exemplo, 5E12, 41B10, 11C5, 21B10, 1F1, 2E12, 5D3, 22F8, 28B11, 41A4 e 43G6) ou o antígeno (por exemplo, a proteína de IL-17F ou o complexo de IL-17A/IL-17F) podem ser imobilizados utilizando a conjugação da biotina e estreptavidina. O anticorpo biotinilado ou moléculas de antígeno podem ser preparados a partir de biotina-NHS (N-hidroxissuccinimida), utilizando técnicas bem conhecidas dentro da técnica (por exemplo, kit de biotinilação, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), e imobilizados nos poços das placas de 96 poços revestidos de estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, outros anticorpos reativos com o anticorpo ou antígeno de interesse, mas que não interferem com a formação do complexo antígeno-anticorpo de interesse, podem ser derivatizados dos poços da placa e não ligados ao anticorpo ou antígeno preso nos poços por conjugação de anticorpos. Métodos para a detecção de tais complexos, além dos descritos acima para complexos imobilizados de GST, incluem imunodetecção de complexos usando tais outros anticorpos reativos com o anticorpo ou antígeno.

A invenção refere-se ainda a novos agentes identificados por qualquer um dos testes de seleção mencionados acima e seus usos para tratamentos como descritos aqui.

Formulações de diagnóstico e profilaxia

Os MAb hulL-17F da invenção são usados em formulações de diagnóstico e profilaxia. Em uma modalidade, um antagonista de IL-17F, tal como um MAb hulL-17F da invenção, é administrado aos pacientes que estão em risco de desenvolver uma ou mais das referidas doenças autoimunes ou inflamatórias, como por exemplo, sem limitação, artrite reumatoide e outras condições artríticas autoimunes, doença de Crohn, psoríase, esclerose múltipla, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, osteoartrite e câncer. Uma predisposição do paciente ou órgãos de uma ou mais das referidas doenças autoimunes ou inflamatórias pode ser determinada usando marcado-

res genotípicos, sorológicos ou bioquímicos.

Em outra modalidade da invenção, um antagonista de IL-17F, tal como um anticorpo de hIL-17F é administrado aos indivíduos humanos diagnosticados com uma indicação clínica associada com uma ou mais das referidas doenças autoimunes ou inflamatórias, tais como artrite reumatoide ou outras condições artríticas autoimunes, doença de Crohn, psoríase, esclerose múltipla, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, osteoartrite e câncer. Após o diagnóstico, um antagonista de IL-17F, tal como um anticorpo hIL-17F, é administrado para mitigar ou reverter os efeitos da indicação clínica associada à artrite reumatoide e outras condições artríticas autoimunes, doença de Crohn, psoríase, esclerose múltipla, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, osteoartrite e câncer.

Anticorpos da invenção também são úteis na detecção de IL-17F e/ou do complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico em amostras de pacientes e, portanto, são úteis como diagnóstico. Por exemplo, os anticorpos hIL-17F da invenção são usados em ensaios *in vitro*, por exemplo, ELISA, para detectar IL-17F e/ou níveis do complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico em uma amostra do paciente.

Em uma modalidade, um anticorpo hIL-17F da invenção é imobilizado em um suporte sólido (por exemplo, o(s) poço(s) de uma placa de microtitulação). O anticorpo imobilizado serve como um anticorpo de captura para qualquer IL-17F e/ou qualquer complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico que possa estar presente em uma amostra de teste. Antes de entrar em contato com o anticorpo imobilizado com uma amostra do paciente, o suporte sólido é lavado e tratado com um agente de bloqueio, tal como uma proteína do leite ou albumina para evitar adsorção não específica do analito.

Posteriormente os poços são tratados com uma amostra de teste suspeita de conter o antígeno, ou com uma solução contendo uma quantidade padrão do antígeno. Essa amostra é, por exemplo, uma amostra de soro de um sujeito suspeito de ter níveis de antígeno circulante considerado como diagnóstico de uma patologia. Depois de enxaguar para fora da amostra de teste ou padrão, o suporte sólido é tratado com um segundo anticorpo

que é rotulavelmente detectado. O segundo anticorpo rotulado serve como um anticorpo de detecção. O nível de rótulo detectável é medido e a concentração de IL-17F e/ou o antígeno do complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico na amostra de teste é determinado pela comparação com uma curva padrão desenvolvida a partir de amostras-padrão.

Será apreciado que com base nos resultados obtidos usando os anticorpos hIL-17F da invenção em um teste de diagnóstico *in vitro*, é possível encenar uma doença (por exemplo, a indicação clínica associada à isquemia, um distúrbio autoimune ou inflamatório) em um sujeito com base em níveis de expressão de IL-17F e/ou do antígeno do complexo de IL-17A/IL-17F heterodimérico. Para uma determinada doença, as amostras de sangue são retiradas de sujeitos diagnosticados como estando em vários estágios na progressão da doença, e/ou em vários pontos no tratamento terapêutico da doença. Usando uma população de amostras que fornece resultados estatisticamente significativos para cada estágio de progressão ou terapia, uma gama de concentrações do antígeno que pode ser considerada característica de cada estágio é designada.

Todas as publicações e documentos de patentes citados aqui estão incorporados por referência como se cada publicação ou documento fosse específico e individualmente indicado para ser incorporado aqui por referência. Citação de publicações e documentos de patentes não se pretendeu como uma admissão de que qualquer estado da técnica pertinente, nem constitui qualquer admissão quanto aos conteúdos ou datas dos mesmos. A invenção descrita agora por meio de descrição escrita será reconhecida por aqueles versados na técnica como uma invenção que pode ser praticada em uma variedade de modalidades e que a descrição acima e exemplos abaixo são para fins de ilustração e não limitação das reivindicações que se seguem.

EXEMPLOS

Os exemplos a seguir, incluindo os experimentos realizados e os resultados alcançados são fornecidos apenas para fins ilustrativos e não devem ser interpretados como uma limitação sobre a presente invenção.

EXEMPLO 1: Clonagem, Expressão e Purificação de IL-17F humano, IL-17F de rato, IL-17F cinomolgo.

Clonagem

Os cDNAs codificando a IL-17F humana madura (AF384857, aa 31-163), IL-17F de rato (AAH91568, aa 21-153) e IL-17F cinomolgo (idêntico à sequência XP_001106517 aa 31-163) foram ampliados por PCR e clonados no vetor PCR4TOPO (Invitrogen). Após mais uma etapa de PCR, uma etiqueta His ou uma etiqueta His seguida por uma etiqueta Avi (Avidity, Denver CO) foram introduzidas na terminação N da sequência de codificação de citocinas. Essas construções foram, então, fundidas a uma sequência líder e subclonadas em um vetor de expressão correspondente.

Expressão e purificação de IL-17F humano e IL-17F de rato a partir de células infectadas por baculovírus

hIL-17F etiquetado His ou IL-17F de rato precedido pela sequência líder de GP67 (MLLVNQSHQGFKNKEHTSKMVSAIVLYVLLAAAAHSAFA) (SEQ ID NO: 100) foram subclonados em um vetor de bacmid baculovírus pFASTBAC Dual (Invitrogen). Após a transfecção em células Sf9, vírus recombinante foi isolado e ampliado. Para a produção de proteínas, células Hi5 ou células Sf9 foram infectadas com baculovírus e incubadas a 27°C durante 3 dias. O meio de cultura celular foi apurado/cleared por centrifugação, filtrado e concentrado cerca de 10 vezes em SartoFlow Slice 200 (Sartorius - Hydrosart corte 10 kD). Após o ajuste de pH para 7,0 e outra etapa de centrifugação, a proteína concentrada foi purificada usando os procedimentos padrão em colunas de Superfluxo Ni-NTA (Qiagen) ou colunas de HP quelante HiTrap (GE Healthcare) carregada com íons Ni^{2+} . IL-17F contendo frações foram reunidas e dessalinizadas em colunas PD-10 (GE Healthcare).

IL-17F humano e IL-17F de rato de células infectadas por baculovírus foram essencialmente livres de contaminantes após uma etapa de purificação e pareceram predominantemente como homodímeros ligados à dissulfeto conforme demonstrado pela SDS-PAGE de não redução. A atividade biológica do IL-17F humano epresso por baculovírus etiquetado His foi

comparável à atividade de citocinas comerciais (hulL-17F expresso por *E. Coli*, Peprotech EC ou R&D Systems)

Expressão e purificação de IL-17F humano e IL-17F de rato a partir de células CHOK1SV

5 Sequências de codificação de hulL-17F ou de IL-17F de rato precedidas pela sequência líder de CD33 (MPLLLLLPLLWAGALAMD; SEQ ID NO:101), além de uma etiqueta His, e uma etiqueta Avi (Avidity, Denver CO) foram colocadas sob o controle do promotor hCMV no vetor de expressão pEE14.4. IL-17F foi expresso a partir de um mRNA bicistrônico contendo
10 um local de entrada de ribossomo interno viral (IRES) e da sequência de codificação GFP como o segundo cistron. O vetor pEE14.4. contém o gene de glutamina sintetase (GS), essencial para a sobrevivência de células transfectadas em meio de seleção contendo sulfoximina metionina (MSX). Transfectantes estáveis foram gerados na linha de células CHOK1SV, propriedade
15 da Lonza Biologics. Após quatro semanas de cultura na presença de clones de alta expressão de MSX foram identificadas, ampliadas e usadas para a produção de IL-17F humano ou de rato.

IL-17F humano e IL-17F de rato expressos por CHOK1SV foram purificados por cromatografia de afinidade de Ni^{2+} . Eles eram essencialmente
20 livres de contaminantes e pareceram como homodímeros ligados ao dissulfeto ou géis de SDS-PAGE de não redução. A atividade biológica do IL-17F humano expresso por CHO etiquetado His+Avi diminuiu significativamente em comparação com a atividade do hulL-17F comercial, provavelmente devido à presença de um etiqueta dupla volumosa/bulky na terminação N.
25

Expressão e purificação de IL-17F cniL-17F humano a partir de células PEAK

Sequências de codificação de hulL-17F etiquetado His ou cniL-17F foram fundidas com a sequência líder de luciferase de *Gaussia princeps* (AF015993) e colocadas sob o controle do promotor EF1 no vetor de expressão episomal pEAK8. A sequência de codificação de citocina foi seguida por um sítio de entrada ribossômica interna viral (IRES) e um segundo
30

cistron (GFP). O vetor de pEAK8 contém o gene de resistência puromicina, o antígeno nuclear de EBV 1 (EBNA1) e a origem de *oriP* de replicação. EBNA1 e *oriP* são necessários para a propagação do vetor de pEAK8 como DNA episomal em células humanas e a geração de transfectantes estáveis.

- 5 Células transfectadas estavelmente foram obtidas após 7-10 dias de cultura na presença de 2 ug/ml de puromicina. As populações de células resistentes a puromicina foram expandidas e usadas para a produção de citocinas.

- PEAK - expresso purificado por cromatografia de afinidade de Ni^{2+} foram > 95% puros e foram encontrados predominantemente na forma de homodímeros ligados a dissulfeto, como demonstrado pela SDS-PAGE de não redução. A atividade biológica de IL-17F humano expresso por PEAK etiquetado His foi similar à atividade de huIL-17F a partir de fontes comerciais.

EXEMPLO 2: Imunizações

- 15 Anticorpos monoclonais totalmente humanos foram gerados usando cepas transgênicas de camundongos em que a expressão do gene do anticorpo do camundongo foi suprimida e substituída por expressão de gene de anticorpo humano. Três cepas de camundongos transgênicos foram utilizadas:

- 20
- 1) camundongo HuMab® (Medarex, Princeton NJ)
 - 2) camundongo KM™, um híbrido entre camundongo HuMab e camundongo do Kirin TC (Kirin Pharma Company,)
 - 3) camundongo KM (FCγRIIb-KO), uma cepa derivada de camundongo KM™, em que o gene *Fcgr2b* codificando para o Fc gama Receptor IIB inibidor foi inativada.

25

- Camundongos foram imunizados seja com IL-17F humano ou ambos; IL-17F humano e IL-17F de rato. Duas formas de antígeno foram utilizadas para imunização: IL-17F não conjugado ou IL-17F conjugado com Keyhole Limpet Hemocianina/Hemocianina do molusco keyhole limpet (K-LH). Estratégias de imunização seguidas de protocolos padrão da literatura.
- 30

Soro de animais imunizados foram selecionados periodicamente por ELISA para a presença de IgG humano dirigido contra huIL-17F e IL-17F

de rato. A maioria dos animais desenvolveu respostas de alta titulação ao IL-17F humano. Quando ambos; IL-17F de ratos e huIL-17 foram utilizados para a imunização, a maioria dos animais desenvolveram respostas de alta titulação para ambos os antígenos. Os anticorpos de reação cruzada para huIL-17A foram gerados esporadicamente em camundongos KM e KM (FCγRIIb-KO) imunizados com huIL-17F como antígeno único (ou seja, sem IL-17F de rato). Contrariamente aos camundongos KM e KM (FCγRIIb-KO), camundongos HuMAb não desenvolveram reação cruzada de títulos para IL-17A, independentemente do protocolo de imunização empregado.

10

EXEMPLO 3: Geração de hibridomas

Fusão de células de linfonodos com células de mieloma SP2/0

Para obter hibridomas, linfonodos de popliteais, inguinais, para-aórticos, submandibulares, axiais, cervicais e braquiais foram retirados dos camundongos e digeridos com collagenase e DNase. A suspensão de células isoladas das células de linfonodos foi misturada na proporção de 1:1 com as células do mieloma SP2/0 e suspensas em Meio de Baixa Condutividade de Citofusão (CPS-LCMC, CytoPulse Sciences, Inc.). Fusões foram feitas com 30 a 60 milhões de esplenócitos no aparelho de Eletrofusão CytoPulse CEEF50 conforme indicado pelo fabricante (Cyto Pulso Sciences, Inc). Após a eletrofusão, as células foram incubadas por cerca de 1 hora a 37°C para permitir a recuperação antes de distribuir em placas de 96 poços.

20

Cultura de hibridomas

Células fundidas foram ressuspensas em meio de seleção de HAT e emplacadas em 44 a 52 placas de 96 poços em uma concentração celular de $0,1-0,2 \times 10^5$ esplenócitos por poço em meio de 200 µl. A seleção de hibridoma prosseguiu durante 14 dias. A fusão de linfonodos de camundongos imunizados resultou na geração de hibridomas produzindo anticorpos específicos para anticorpos de huIL-17F ou de reação cruzada específicos para ambos; huIL-17F e IL-17A.

25

30

Seleção de hibridoma

Quatorze dias após a fusão, placas contendo hibridoma foram selecionadas para a presença de ligação de IgG humano ao IL-17F humano

e/ou IL-17A humano por Flisa (Fluorescence-Linked Immunosorbent Assay). Em resumo, esferas/contas de 6 microns (Polycontas, cat. No 07312, Polysciences Inc.) foram revestidas com hUL-17F (ambos do Peprtech CE) ou BSA (Sigma) e foram distribuídas em placas ópticas de 384 poços FMAT® (Applied Biosystems) a uma densidade de 5.000 esferas por poço. As esferas foram misturadas com um pequeno volume de sobrenadantes de cultura de hibridoma (30 µl por poço) e incubadas durante a noite antes da adição IgG Fc anti-humano de cabra (Jackson ImmunoResearch No 109-005-098), conjugada com corante FMAT Blue® (Applied Biosystems). Após um período de incubação de 2 a 8 horas a fluorescência das esferas foi medida em um analisador de Sistema de Detecção de Celular 8200 (Applied Biosystems). Hibridomas produzindo IgGs humanos que se ligaram ao hUL-17F, mas não ao BSA, foram expandidos e submetidos a uma análise adicional.

EXEMPLO 4: Geração de anticorpos recombinantes

Clonagem de sequência de anticorpos a partir de Hibridoma

Para isolar sequências de cadeia pesada e leve variáveis de anticorpos, o RNA foi extraído primeiro de hibridoma selecionado e submetido à transcrição reversa. Depois, sequências de VH e VL foram ampliadas por PCR, clonadas e adicionalmente analisadas por sequenciamento de DNA. Em resumo, a amostra de RNA foi extraída do hibridoma usando o kit RNeasy Plus kit (QIAGEN) e cDNA foram gerados usando esferas prontas-para-ir você-primer primeira-vertente (GE Healthcare, n° 27-9264-01) com primers de oligo dT para a transcrição reversa. Sequências de VH e VL foram ampliadas por PCR usando conjuntos de primers reconhecendo famílias de cadeias pesadas e leves variáveis. Sequências ampliadas foram clonadas no vetor pCR® 4 usando kit de clonagem TOPO® TA para Sequenciamento (Invitrogen). Clones selecionados foram, então, sujeitos ao sequenciamento de DNA.

Reformatação, germinação e expressão de anticorpos

Sequências de cadeia pesada e leve variáveis foram reformata-das em vetores de expressão de mamífero para a produção e caracterização de anticorpos. Em resumo, análise da sequência foi realizada com VH e VL

isolados para determinar a sua linhagem germinativa. Devido às incompatibilidades de primer, mutações foram introduzidas em 5' VLs de 1F1 e 11C5 durante a etapa de ampliação por PCR. Portanto, mutagênese dirigida ao sítio, conduzida com o kit Quikchange (Stratagene), foi usada para converter estas mutações de volta para a sequência da linha germinativa Humana. Depois, as sequências de VH e VL foram subclonadas em sistemas de expressão de mamífero na moldura de IgG1 Humano e espinhas dorsais IgCapa. Vetores correspondentes de cadeias leves e pesadas de anticorpos foram, então, transfectados em células PEAK® usando o reagentes de transfecção *TransIT®-LT1* (Mirus Bio) e cultivados em DMEM + IgG com depleção de soro + Glutamina. Anticorpos expressos por PEAK foram então purificados do sobrenadante usando lodo/slurry de MabSelectSure (GE Healthcare).

EXEMPLO 5: reatividade cruzada de anticorpos huIL-17F

Ensaio de ligação: anticorpos huIL-17F foram testados quanto à sua capacidade de se ligar aos outros membros da família de IL-17 das citocinas, bem como a IL-17A e IL-17F de outras espécies. O ensaio foi realizado no formato FLISA, como descrito acima. As seguintes citocinas recombinantes foram ligadas às esferas de poliestireno e testadas quanto às suas capacidades de se ligarem aos anticorpos huIL-17F: huIL17B (PeprotechEC, cat No 200-28), huIL-17C (R&D Systems, cat No), huIL-17D (PeprotechEC, cat No 200-27), huIL-17E (huIL-25, PeprotechEC, cat No 200-24), huIL-17A (PeprotechEC, cat No 210-17), huIL-17F (PeprotechEC, cat No 200-17F), IL-17F de rato (etiquetado His, produzido em casa em células de insetos), IL-17A de rato (etiquetado His, produzido em casa em células de PEAK), cyIL-17F (etiquetado His, produzido em casa em células de PEAK) e cyIL-17A (etiquetado His, produzido em casa em células de PEAK). A capacidade do indivíduo dos anticorpos huIL-17F para se ligarem a essas citocinas diferentes está resumida na Tabela 3 abaixo:

Tabela 3: A reatividade cruzada de anticorpos huIL-17F, conforme determinado pelo Flisa (nt=não testado)

Espécies		Humana							Cinomolgos			Camundongo			Rato	
Dimero:	Nome do clone	IL-17F	IL-17A	IL-17A/F	IL-17B	IL-17C	IL-17D	IL-17E	IL-17F	IL-17A	IL-17A/F	IL-17F	IL-17A	IL-17A/F	IL-17F	IL-17A
5E12		+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
41B10		+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
11C5		+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
21B10		+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
1F1		+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
2E12		+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
5D3		+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
22F8		+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
28B11		+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
41A4		+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
43G6		+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-

EXEMPLO 6: potência de neutralização de anticorpos huIL-17F

Secreção de IL-6 por fibroblastos embrionários de camundongo estimulados por IL-17

- IL-17A e IL-17F humanos e cinomolgos se ligam ao complexo de receptor de IL-17 do camundongo correspondente. Como consequência, os fibroblastos de camundongo respondem aos IL-17A e IL-17F humanos ou cinomolgos, secretando IL-6. Coestimulação com camundongo TNF mostrou sinergia com a sinalização de IL-17 (Ruddy et al. 2004, J. Biol. Chem 279:2559) aumentando significativamente a sensibilidade dos fibroblastos de camundongo para citocinas IL-17. C57BL de camundongo/6 fibroblastos embrionários (MEF, ATCC No SCRC-1008) foram, portanto, usados para ensaio para a capacidade de neutralização de anticorpos de huIL-17F, cyIL-17F, heterodímero de huIL-17A/F e atividade biológica de heterodímero de cy IL-17A/F.
- Resumidamente, as células MEF semeadas em placas de 96 poços em DMEM + Glutamina + 10% de soro fetal bovino (FBS) foram cultivadas durante 48 h antes da adição de citocinas de IL-17 e $TNF\alpha$ de camundongo em 10 ng/ml (Peprotech cat No 315-01A). Em ensaios para atividade de neutralização de MAb, as citocinas de IL-17 foram pré-incubadas com o anticorpo durante 1 hora antes de adicionar às células. Após 24 horas de estimulação na presença de heterodímeros de IL-17A/F humanos ou cinomolgos (50 ng/ml) ou após 40 horas de estimulação na presença de IL-17F de humanos ou cinomolgos (5 ng/ml), sobrenadantes foram coletados e a concentração de IL-6 de camundongo foi medida por ELISA sanduíche usando o anticorpo anticamundongo IL-6 de rato (BD cat No 554400) para captura e um segundo, anticorpo anti camundongo IL-6 de rato biotinilado (BD 554402) mais HRP de estreptavidina (Jackson ImmunoResearch 016-030-084) para detecção. Nenhuma inibição de heterodímero de huIL-17A/F ou heterodímero de cyIL-17A/F foi observada com qualquer um dos anticorpos IL-17F testados. Os valores de IC_{50} obtidos com homodímeros de IL-17F humanos e cinomolgos estão resumidos na Tabela 4 a seguir e foram obtidos a partir de curvas de calibração de IL-6 usando técnicas estatísticas pa-

drão.

Tabela 4: Potência de neutralização (valores de IC₅₀) de anticorpos hIL-17F em células MEF estimuladas com homodímeros de hIL-17F ou IL-17F e mTNF- α

Espécies	humana	cinomolgos
dímero de IL-17:	IL-17F	IL-17F
conc. de IL-17	5 ng/ml	5 ng/ml
Nome do clone	IC50 (nM)	
5E12	1.8	22
41B10	3.9	18
11C5	0.4	2.9
21B10	2.0	8.7
1F1	1.1	11
2E12	5.9	26
5D3	0.5	12
22F8	2.0	10
28B11	1.2	6.3
41A4	0.6	7.2
43G6	1.1	8.4

5

EXEMPLO 7: Modelo experimental de doença: artrite induzida por colágeno (CIA)

IL-17A desempenha um papel importante na patogênese da artrite, promovendo a liberação de mediadores da inflamação e destruição da cartilagem. A neutralização de IL-17A demonstrou atenuar a artrite em vários modelos experimentais, incluindo CIA (artrite induzida por colágeno). Dado que o IL-17F está intimamente relacionado com IL-17A, e o fato de que ela é super expressada na sinóvia dos pacientes de artrite reumatoide (RA), o efeito de neutralização dessa citocina foi explorado em um modelo de RA. Para este objetivo, um anticorpo anti MIL-17F (IL-17F de camundongo) que neutralizou potencialmente homodímeros de IL-17F de rato - mas não heterodímeros de IL-17A/F - foi gerado, e os efeitos deste anticorpo anti-MIL-17F no modelo animal de CIA para RA foi testado.

15

Em suma, camundongos DBA-1J machos de 8-10 semanas de

idade foram imunizados com 100 microgramas de colágeno bovino tipo II em Adjuvante Completo de Freund (CFA). Colágeno tipo II em CFA foi injetado por via intradérmica na base da cauda. Três semanas depois, 100 microgramas de colágeno tipo II em adjuvante incompleto de Freund (IFA) foram
5 injetados via intradérmica para induzir a doença. Os primeiros sinais da doença geralmente apareceram 4 a 10 dias após o impulso de colágeno-IFA. Animais que começaram a desenvolver artrite foram recrutados para o estudo e distribuídos nos grupos de tratamento a seguir:

- 1) controle de isótipo (camundongo IgG1k), duas vezes por se-
10 mana durante três semanas a 300 microgramas por injeção (n=10)
- 2) Hamster murino quimérico anti TNF-alfa, uma vez por semana durante três semanas a 300 microgramas por injeção (n=10)
- 3) Anticorpos anti IL-17F de camundongo (IgG1k de camundon-
15 go) duas vezes por semana durante três semanas a 300 microgramas por injeção (n=11)

Os três grupos de tratamento foram balanceados para conter número equivalente de animais recrutados em diferentes pontos de gravida-
de clínica (1-3). Pontuação clínica da doença foi realizada três vezes por semana usando métodos de pontuação de artrite padrão. A pontuação foi 0-
20 4 por pata (onde 0 significa ausência de doença e 4 representa edema que envolve toda a pata), com uma pontuação máxima teórica cumulativa de 16 pontos por animal. Além de pontuar a gravidade clínica, níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias chaves foram determinados por Luminex no término (dia 22, após recrutamento).

25 A progressão dos pontos clínicos e os níveis de soro de citocinas são mostrados nas figuras 1 e 2, respectivamente. A neutralização dos homodímeros de IL-17F foi suficiente para atrasar significativamente a progressão da doença e reduzir os níveis de mediadores inflamatórios. Estes achados sugerem que IL-17F é um alvo candidato para a terapia de doenças
30 autoimunes tais como artrite reumatoide.

A invenção tendo sido descrita por meio de descrição escrita e exemplo, aqueles versados na técnica reconhecerão que a invenção pode

ser praticada em uma variedade de modalidades e que a descrição e os exemplos acima são para fins de ilustração e não de limitação das reivindicações seguintes.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo anti-IL-17F monoclonal totalmente humano isolado ou fragmento do mesmo, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo compreende:

- 5 (a) uma região V_H CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 45;
- (b) uma região V_H CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 46;
- (c) uma região V_H CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 47;
- 10 (d) uma região V_L CDR1 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 74;
- (e) uma região V_L CDR2 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 75; e
- 15 (f) uma região V_L CDR3 compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 76;

em que o referido anticorpo se liga a IL-17F.

2. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo não se liga ao homodímero de IL-17A.

20 3. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo é um isótipo de IgG.

4. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo é um isótipo de IgG1.

25 5. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 10, e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 12 ou 103.

30 6. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo como definido na reivindicação 1 e um veículo.

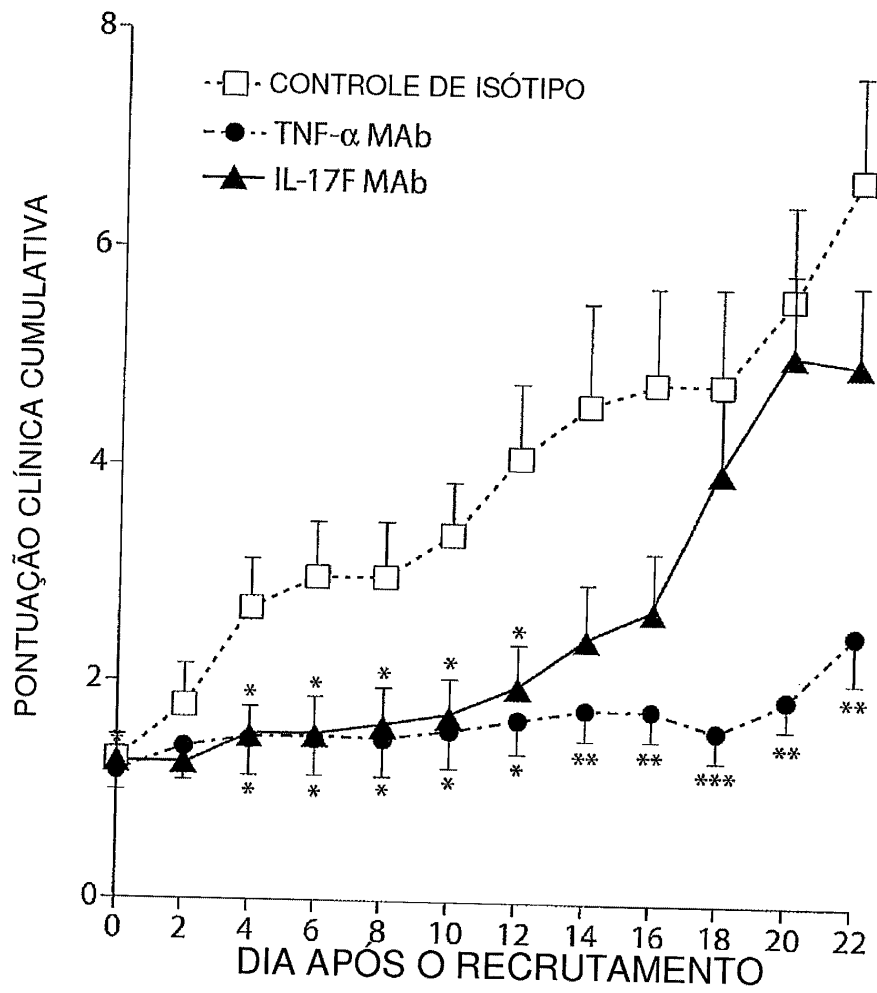


Fig. 1

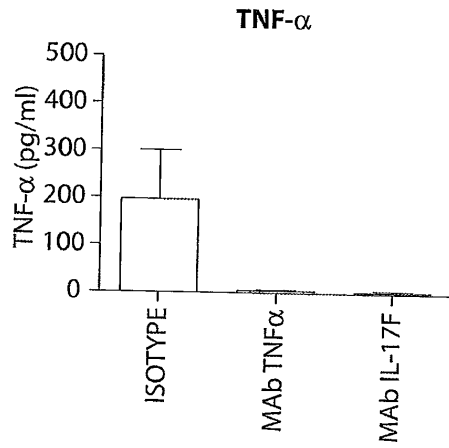


Fig. 2A

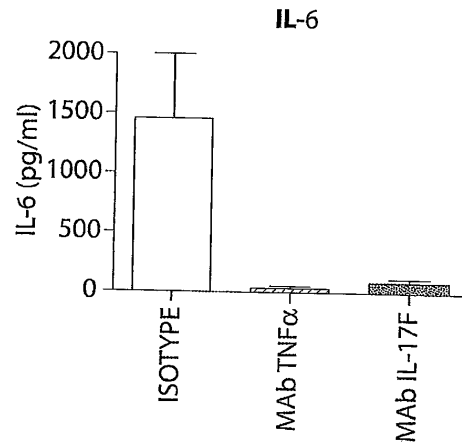


Fig. 2B

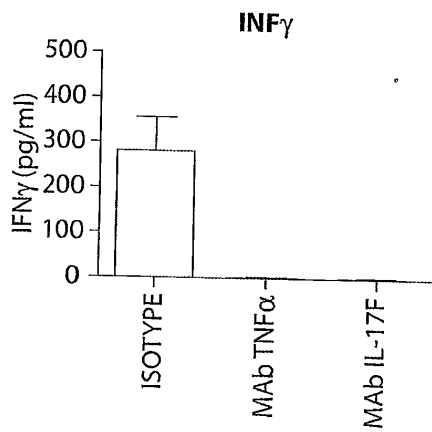


Fig. 2C

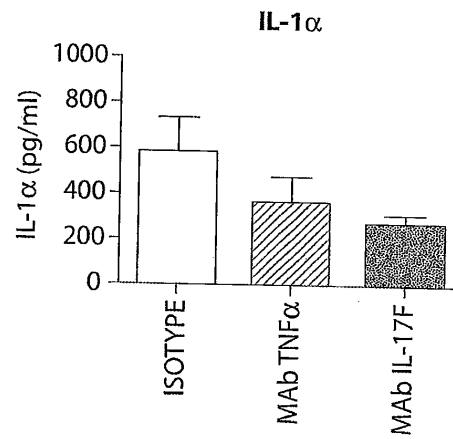


Fig. 2D

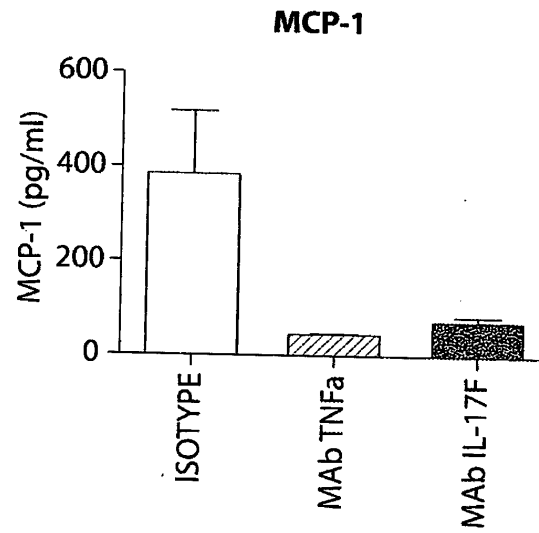


Fig. 2E

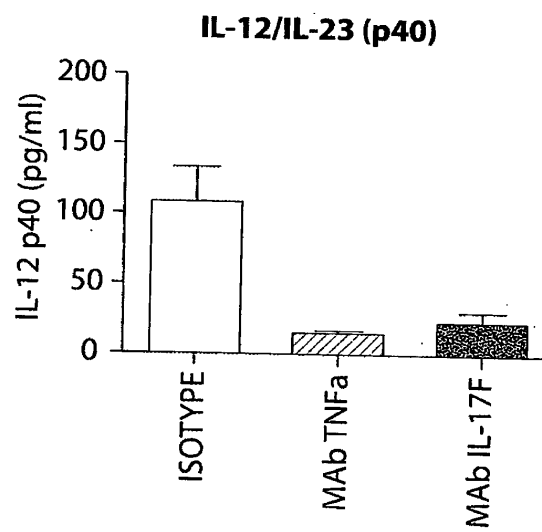


Fig. 2F