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

(21) **PI0608210-6 A2**

* B R P I 0 6 0 8 2 1 0 A 2 *

(22) Data de Depósito: 14/02/2006
(43) Data da Publicação: 09/11/2010
(RPI 2079)

(51) Int.Cl.:
G01N 33/86
G01N 33/68
A61K 38/00
A61K 39/00
A61P 11/00

(54) Título: **MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE UM DISTÚRBIO RELACIONADO COM IL-17F EM UM INDIVÍDUO E DE SELEÇÃO DE COMPOSTOS CAPAZES DE INIBIREM A LIGAÇÃO DE IL-17F EM IL-17R, USO DE UM ANTAGONISTA DE IL-17F, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, ADJUVANTE DE VACINA**

(30) Prioridade Unionista: 14/02/2005 US 60/653186

(73) Titular(es): UNIVERSITY OF PITTSBURGH OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION, WYETH

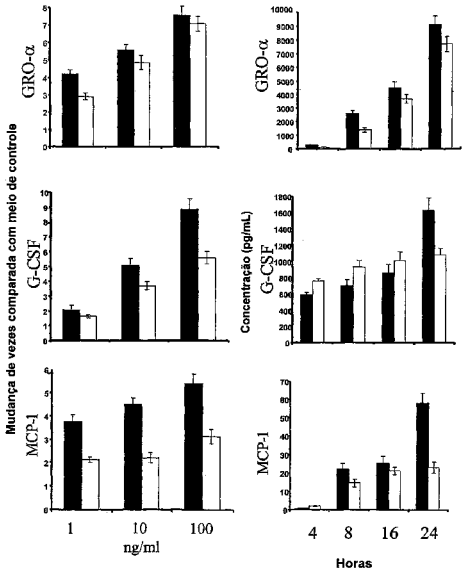
(72) Inventor(es): Beatriz M. Carreno, Florencia Marine McALLister, Jay K. Kolls, Samuel J. Goldman

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2006005273 de 14/02/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/088925de 24/08/2006

(57) Resumo: METODOS DE DIAGNÓSTICO DE UM DISTÚRBIO RELACIONADO COM IL-17F EM UM INDIVÍDUO E DE SELEÇÃO DE COMPOSTOS CAPAZES DE INIBIREM A LIGAÇÃO DE IL-17F EM IL-17R, USO DE UM ANTAGONISTA DE IL-17F, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, ADJUVANTE DE VACiNA A invenção refere-se às descobertas de que inflamação das vias aéreas mediada por IL- 1 7F pode ser mediada via sinalização por intermédio de IL- 1 7R sobre a superfície basolateral de células epiteliais respiratórias de humano. Assim, a presente invenção proporciona polipeptídeos e polinucleotídeos IL-17F ou IL-17R isolados e purificados. A presente invenção também é direcionada aos métodos novos para selecionar compostos de teste capazes de inibirem, i . e., diminuírem, limitarem, bloquearem, ou diferentemente reduzirem a atividade de IL- 1 7F, e aosmétodos para diagnosficar, prognosticar, e monitorar o progresso de distúrbios relacionados com a bioatividade de IL-l 7F, e.g., distúrbiosrelacionados com os efeitos de ligação de IL- 1 7F em IL- 1 7R em inflamação das vias aéreas, e.g., em pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos. A presente invençãoé adicionalmente direcionada aos novos agentes terapéuticos e alvos terapêuticos e aos métodos para a intervenção (tratamento) e a prevenção de citados distúrbios relacionados com a bioatividade de IL- 1 7F.



"MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE UM DISTÚRBIO RELACIONADO COM IL-17F EM UM INDIVÍDUO E DE SELEÇÃO DE COMPOSTOS CAPAZES DE INIBIREM A LIGAÇÃO DE IL-17F EM IL-17R, USO DE UM ANTAGONISTA DE IL-17F, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, ADJUVANTE DE VACINA"

Pedidos Relacionados

Este pedido reivindica prioridade ao Pedido Provisório de Patente U.S. de No. 60/653,186, depositado aos 14 de fevereiro de 2005, que é por meio deste aqui incorporado em sua totalidade como referência.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Campo da invenção

Esta invenção refere-se à caracterização dos efeitos de ligação de IL-17F em IL-17R; em particular, a invenção refere-se aos efeitos da ligação de IL-17F em IL-17R em inflamação das vias aéreas, e.g., em pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos.

Arte Anterior Relacionada

IL-17A é uma citocina pró-inflamatória que regula tanto granulopoiese quanto recrutamento de neutrófilos em sítios de inflamação (Yao et al. (1995) *J. Immunol.* 155:5483-86; Ye et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194:519-28; Kolls et al. (2003) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28:9-11; Laan et al. (1999) *J. Immunol.* 162:2347-52; Linden et al. (2000) *Eur. Respir.* J. 15:973-77). Isto é devido, em parte, à capacidade de IL-17A de ambos induzir a liberação de quimiocinas CXC e de regular a expressão de G-CSF, um fator de crescimento granulopoiético crítico (Laan, *supra*; Moseley et al. (2003) *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:155-74; Jones e Chan (2002) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26:748-53; Ye et al. (2001) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25:335-40; Ye et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194:519-28). Camundongos com

uma deleção homozigótica do receptor para IL-17A, i.e., receptor de IL-17 (IL-17R), possuem letalidade intensificada, recrutamento de neutrófilo defeituoso, e granulopoiese diminuída em pneumonia Gram-negativa experimental (Ye et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194:519-28). Contudo, não possuem uma suscetibilidade aumentada às infecções intracelulares causadas por *Listeria monocytogenes* ou *Mycobacteria tuberculosis* (observações não publicadas). Este defeito na defesa do hospedeiro é provavelmente devido, em parte, a uma redução maior do que 90% em G-CSF em resposta ao desafio bacteriano Gram-negativo em camundongos deficientes em IL-17R comparados com camundongos de controle, bem como uma resposta significativamente atenuada à infecção (Ye et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194:519-28).

Recentemente cinco outras proteínas, em adição à IL-17A, têm sido identificadas como membros da família de proteínas IL-17; IL-17F possui a homologia de seqüência mais próxima (58% em nível de proteína) à IL-17A, bem como uma indução similar de quimiocinas CXC e perfis de mobilização de neutrófilo similar (Moseley et al., *supra*; Li et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:773-78; Starnes et al. (2001) *J. Immunol.* 167:4137-40; Starnes et al. (2002) *J. Immunol.* 169:642-46; Hurst et al. (2002) *J. Immunol.* 169:443-53; Aggarwal e Gurney (2002) *J. Leukoc. Biol.* 71:1-8; Hymowitz et al. (2001) *EMBO J.* 20:5332-41). IL-17A e IL-17F jazem imediatamente adjacentes uma à outra em cromossomo 1 de camundongo e em cromossomo 6 de humano, e ambas citocinas são produzidas por células T em resposta à IL-23 (Chmiel et al. (2002) *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 23:5-27; Aggarwal et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278(3):1910-14; Happel et al. (2003) *J. Immunol.* 170:4432-36; Kolls et al. (2004) *Immunity* 21:467-76). Em adição, IL-17A e IL-17F são induzidas em um curso de tempo similar no pulmão em pneumonia Gram-negativa experimental (observações não publicadas). Embora IL-17F possua uma afinidade menor por IL-17R, em

uma ordem de magnitude em comparação com IL-17A, tem havido alguma especulação se ambas IL-17A e IL-17F sinalizam via IL-17R porque as duas proteínas compartilham atividades biológicas similares (Hymowitz et aL, *supra*).

Até o presente, a interação entre IL-17F e IL-17R não tem sido caracterizada. Conseqüentemente, uma correlação direta entre sinalização mediada por IL-17F e inflamação das vias aéreas não tem sido definitivamente provada. A presente invenção proporciona esta correlação. Em particular, a correlação proporcionada pela presente invenção permite o diagnóstico, o prognóstico, a monitoração e/ou o tratamento de inflamação das vias aéreas, e.g., em pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos, via métodos que detectam IL-17F.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

São descritos métodos de seleção de compostos de teste capazes de inibirem, e.g., diminuírem, limitarem, bloquearem, ou diferentemente reduzirem inflamação das vias aéreas mediada por IL-17F. Também, são descritos métodos de diagnóstico, prognóstico, monitoração e/ou tratamento de inflamação das vias aéreas, e.g., em pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos, compreendendo detecção de IL-17F.

Mostrou-se que, em pulmão de humano, IL-17R é expressado em células epiteliais respiratórias com uma expressão maior sobre superfícies basolaterais comparadas com superfícies apicais. Adicionalmente, a expressão aumentada de IL-17R sobre a superfície basolateral de células epiteliais respiratórias está correlacionada com uma indução mais potente de fatores de crescimento (e.g., IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, MCP-1, MIP-1β, TNF-α, GRO-α, etc.) por IL-17F basolateralmente fornecida comparada com IL-17F

apicalmente fornecida. Dentre estes fatores de crescimento fatores de crescimento induzidos, GRO-α, G-CSF, IL-6, e IL-8 demonstraram a indução mais alta de expressão em células HBE de todos os doadores testados (n>7). Em adição, os inventores demonstraram que um anticorpo anti-IL-17R inibitório significativamente atenuou indução mediada por IL-17F de produção de citocina/quimiocina, proporcionando evidência adicional de que IL-17F induz produção de citocina/quimiocina em células HBE por ligação em IL-17R. Os inventores também demonstraram que IL-17F foi detectável em todas as amostras testadas no primeiro dia de hospitalização de pacientes com fibrose cística que também estavam sofrendo de exacerbação pulmonar. Adicionalmente, os inventores demonstraram que um declínio significativo em níveis de IL-17F em amostras coletadas destes pacientes correlacionou com o tratamento da exacerbação pulmonar.

Conseqüentemente, em um aspecto, a invenção proporciona métodos de seleção de compostos de teste capazes de inibirem, e.g., diminuírem, limitarem bloquearem, ou diferentemente reduzirem a interação entre IL-17F e IL-17R. Os métodos aqui descritos compreendem as etapas de contatar uma amostra contendo IL-17F e IL-17R com o composto, e determinar se a interação de IL-17F com IL-17R na amostra é diminuída em relação à interação de IL-17F com IL-17R em uma amostra não contatada com o composto, por meio do qual uma diminuição na interação de IL-17F com IL-17R na amostra contatada com o composto identifica o composto como um que inibe a interação de IL-17F com IL-17R. Em uma modalidade da invenção, uma diminuição na interação de IL-17F com IL-17R é detectada como um decréscimo em indução mediada por IL-17F de expressão de citocina, quimiocina e/ou fator de crescimento.

Em outro aspecto, a invenção adicionalmente caracteriza-se por métodos de diagnóstico, prognóstico e/ou monitoração de um distúrbio relacionado com IL-17F em um indivíduo, compreendendo as etapas de

detectar uma quantidade de teste de um produto de gene de IL-17F em uma amostra do indivíduo, e comparar a quantidade de teste do produto de gene de IL-17F em uma amostra de controle, por meio do qual uma quantidade de teste significativamente acima da quantidade normal proporciona uma indicação positiva no diagnóstico de um distúrbio relacionado com IL-17F. Em uma modalidade da invenção, os métodos são direcionados ao diagnóstico, ao prognóstico, e/ou à monitoração de inflamação das vias aéreas, e.g., à inflamação das vias aéreas que resulta em exacerbação pulmonar, inflamação das via aéreas em um paciente com fibrose cística, etc. Em outras modalidades, os métodos da invenção envolvem detecção de uma proteína IL-17F, e.g., com um anticorpo anti-IL-17F.

Em outro aspecto, a invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo sob risco de, ou diagnosticado com, inflamação das vias aéreas, e.g., em pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos. Os métodos de tratamento aqui descritos compreendem a etapa de administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente efetiva de um antagonista de IL-17F.

Em uma modalidade, a presente invenção proporciona um método de diagnóstico de um distúrbio relacionado com IL-17F em um indivíduo, compreendendo as etapas de detectar uma quantidade de teste de um produto de gene de IL-17F em uma amostra do indivíduo; e comparar a quantidade de teste com uma quantidade normal do produto de gene de IL-17F em uma amostra de controle, por meio do qual uma quantidade de teste significativamente acima da quantidade normal proporciona uma indicação positiva no diagnóstico relacionado com IL-17F. Em outra modalidade, o distúrbio relacionado com IL-17F é inflamação das vias aéreas. Em outra modalidade, o indivíduo é um paciente diagnosticado com fibrose cística. Em outra modalidade, o indivíduo está sofrendo de uma exacerbação pulmonar. Em uma outra modalidade, a exacerbação pulmonar é devido a um agente

infeccioso. Em outra modalidade, o produto de gene de IL-17F é uma proteína IL-17F. Em uma outra modalidade, a proteína IL-17F é detectada com um anticorpo anti-IL-17F.

Em outra modalidade, a invenção proporciona um método de seleção de compostos capazes de inibirem a ligação de IL-17F em IL-17Rcompreendendo as etapas de contatar IL-17F e IL-17R com um composto; e determinar se a ligação de IL-17F em IL-17R na amostra contatada com o composto de teste é diminuída em relação à ligação de IL-17F em IL-17R em uma amostra não contatada com o composto, por meio do qual uma diminuição na ligação de IL-17F em IL-17R na amostra contatada com o composto identifica o composto como um que inibe a ligação de IL-17F em IL-17R.

Em outra modalidade, a invenção proporciona um método de tratamento de um indivíduo sob risco de, ou diagnosticado com, um distúrbio relacionado com IL-17F compreendendo administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente efetiva de um antagonista de IL-17F. Em outra modalidade, o distúrbio relacionado com IL-17F é inflamação das vias aéreas. Em outra modalidade, o indivíduo é um paciente diagnosticado com fibrose cística. Em outra modalidade, o indivíduo está sofrendo de uma exacerbação pulmonar. Em uma outra modalidade, a exacerbação pulmonar é devido a um agente infeccioso. Em outra modalidade, o antagonista de IL-17F é selecionado do grupo consistindo de um anticorpo anti-IL-17F inibitório, um anticorpo anti-IL-17R inibitório, IL-17R solúvel, uma proteína de fusão contendo IL-17R, uma proteína de fusão contendo um fragmento ligante de IL-17F de IL-17R, uma molécula pequena antagonística, uma molécula de ácido nucleico de IL-17F anti-sentido, uma molécula de ácido nucleico de IL-17R anti-sentido, uma molécula de ácido nucleico de siRNA IL-17F, e uma molécula de ácido nucleico de siRNA IL-17R. Em outra modalidade, a invenção adicionalmente compreende administração ao indivíduo de uma

quantidade terapeuticamente efetiva de pelo menos um agente terapêutico adicional. Em uma outra modalidade, o pelo menos um agente terapêutico adicional é selecionado do grupo consistindo de inibidores de citocina, inibidores de fator de crescimento, imunossupressores, agentes antiinflamatórios, inibidores metabólicos, inibidores de enzima, agentes citotóxicos, e agentes citostáticos. Em outra modalidade adicional, o pelo menos um agente terapêutico adicional é selecionado do grupo consistindo de antagonistas de TNF, agentes anti-TNF, antagonistas de IL-12, antagonistas de IL-15, antagonistas de IL-17, antagonistas de IL-18, antagonistas de IL-22, agentes diminuidores de célula-T, agentes diminuidores de célula B, ciclosporina, FK-506, CCI-779, etanercepte, infliximabe, rituximabe, adalimumabe, prednisolona, azatioprina, ouro, sulfasalazina, cloroquina, hidróxi-cloroquina, minociclina, anaquinra, abatacepte, metotrexato, leflunomida, rapamicina, análogos de rapamicinas, inibidores de Cox-2, inibidores de cPLA2, NSAIDs, inibidores de p38, antagonistas de B7.1, B7.2, ICOSL, ICOS e/ou CD28, e agonistas de CTLA4.

Em outra modalidade, a invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um antagonista de IL-17F e um carreador farmaceuticamente aceitável. Em outra modalidade, o antagonista de IL-17F é selecionado do grupo consistindo de um anticorpo anti-IL-17F inibitório, um anticorpo anti-IL-17R inibitório, IL-17R solúvel, uma proteína de fusão contendo IL-17R, uma proteína de fusão contendo um fragmento ligante de IL-17F de IL-17R, uma molécula pequena antagonística, uma molécula de ácido nucleico de IL-17F anti-sentido, uma molécula de ácido nucleico de IL-17R anti-sentido, uma molécula de ácido nucleico de siRNA IL-17F, e uma molécula de ácido nucleico de siRNA IL-17R.

Em outra modalidade, a invenção proporciona um adjuvante de vacina compreendendo um antagonista de IL-17F e um antígeno bacteriano. Em outra modalidade, o antagonista de IL-17F é selecionado do

grupo consistindo de um anticorpo anti-IL-17F inibitório, um anticorpo anti-IL-17R inibitório, IL-17R solúvel, uma proteína de fusão contendo IL-17R, uma proteína de fusão contendo um fragmento ligante de IL-17F de IL-17R, uma molécula pequena antagonística, uma molécula de ácido nucleico de IL-17F anti-sentido, uma molécula de ácido nucleico de IL-17R anti-sentido, uma molécula de ácido nucleico de siRNA IL-17F, e uma molécula de ácido nucleico de siRNA IL-17R.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Concentrações (mudança de vezes comparada com o meio de controle; eixo-y) de níveis de proteína GRO-α, G-CSF e MCP-1 em meio basolateral coletado de células epiteliais bronquiais de humano (HBE) primárias tratadas por 24 horas com 1 ng/ml, 10 ng/ml, ou 100 ng/ml (eixo-x) de qualquer um de IL-17A (■) ou IL-17F (□) são mostradas na **FIG: 1** (painéis esquerdos). Não mostradas na **FIG.1** (painéis direitos) as concentrações (pg/ml; eixo-y) de GRO-α, G-CSF, e MCP-1 em meio basolateral coletado de células HBE estimuladas com 10 ng/ml de qualquer um de IL-17A (■) ou IL-17F (□) por 4, 8, 16 ou 24 h (eixo-x). Resultados são expressados como a média ± SEM de três amostras de um experimento representativo.

São mostradas na **FIG: 2** concentrações (mudança de vezes comparada com o meio de controle; eixo-y) de **A**) GRO-α em meio basolateral coletado de células HBE primárias tratadas com uma das seguintes quatro condições (eixo-x): IL-17F (10 ng/ml), TNF-α (1 ng/ml), IL-17F (10 ng/ml) + TNF-α (1 ng/ml), ou IL-17F + TNF-α pré-incubado com um mAb anti-IL-17R, **B**) G-CSF em meio basolateral coletado de células HBE primárias tratadas com uma da seguintes quatro condições (eixo-x): IL-17F (10 ng/ml), TNF-α (1 ng/ml), IL-17F (10 ng/ml) + TNF-α (1 ng/ml), IL-17F + TNF-α pré-incubado com IL-17R-Fc (1 μg/ml) ou IL-17F + TNF-α pré-incubado com um mAb anti-IL-17R, ou **C**) G-CSF em meio basolateral

coletado de células HBE primárias tratadas com uma das seguintes quatro condições (eixo-x): IL-17A (10 ng/ml), TNF-α (1 ng/ml), IL-17A (10 ng/ml) + TNF-α (1 ng/ml), IL-17A + TNF-α pré-incubado com IL-17R-Fc (1 μg/ml), ou IL-17A + TNF-α pré-incubado com um mAb anti-IL-17R. Resultados são expressados como a média ± SEM de três experimentos separados (* denota $p < 0,05$ por ANOVA).

FIG. 3 mostra as concentrações (mudança de vezes comparada com o meio de controle; eixo-y) de **A**) GRO-α e **B**) G-CSF em meio apical ou basolateral coletado de células HBE primárias que foram quer pré-tratadas com 2 μg/ml de anticorpo de receptor de IL-17 (anti-IL-17R) por 30 minutos (segunda e quarta barras em cada gráfico) quer não tratadas (primeira e terceira barras) antes de incubação de 24 horas com qualquer um de 10 ng/ml de IL-17A ou de IL-17F. Resultados são expressados como a média ± SEM de três experimentos separados (* denota $p < 0,05$ por ANOVA).

FIG. 4 mostra níveis de expressão comparativos de DEFB104 (eixo-y), conforme analisado por PCR em tempo real, relativamente quantificado para níveis de expressão de 18s, e normalizado com o controle, e em células HBE primárias que foram **A**) estimuladas com 1 ng/ml, 10 ng/ml, ou 100 ng/ml (eixo-x) de IL-17A (■) ou IL-17F(▒) por 24 h., **B**) pré-incubadas com um anticorpo anti-IL-17R antes da adição de IL-17A ou IL-17F no meio, ou **C**) incubadas com apenas IL-17A, apenas IL-17F, apenas TNF-α, ou TNF-α com qualquer uma de IL-17A ou IL-17F. Resultados são expressados como a média ± SEM de três experimentos separados (* denota $p < 0,05$ por ANOVA).

São mostradas na **FIG. 5** as concentrações de G-CSF (■) e de GRO-α (□) (mudança de vezes comparada com o controle; eixo-y) por células HBE primárias após adição de 10 ng/ml de qualquer uma de IL-17A ou IL-17F em superfície basolateral ou apical. Resultados são expressados como a média ± SEM de três experimentos separados (* denota $p < 0,05$ por

ANOVA).

FIG. 6 mostra as concentrações (mudança de vezes comparada com o meio de controle; eixo-y) de G-CSF em **A**) meio apical ou basolateral coletado de células HBE primárias que foram tratadas com 10 ng/ml de IL-17F e/ou 10 ng/ml de TNF-α (eixo-x) por 24 horas, **B**) meio basolateral coletado de células HBE pré-tratadas com anti-TNF-RI de humano e/ou quimera de TNF-RII:Fc (0,5 μg/ml) 2 horas antes da incubação de 24 horas com qualquer um de 10 ng/ml de IL-17F e/ou de 10 ng/ml de TNF-α, ou **C**) meio basolateral coletado de células HBE pré-tratadas com anti-TNF-RI de humano e/ou quimera de TNF-RII:Fc (0,5 μg/ml) 2 horas antes da incubação de 24 horas com qualquer um de 10 ng/ml de IL-17A e/ou 10 ng/ml de TNF-α. Resultados são expressados como a média ± SEM de três experimentos separados (* denota $p < 0,05$) por ANOVA).

FIG. 7 mostra as concentrações (pg/ml; eixo-y) de **A**) IL-17A e IL-17F, e **B**) (painel superior) IL-8, e (painel inferior) IL-6, GM-CSF, G-CSF, MCP-1, MIP-1β, IL-1β, e TNF-α em amostras de saliva obtidas de pacientes com fibrose cística que estão sofrendo de exacerbação pulmonar antes do tratamento (PRÉ-tratamento), 10 dias após o tratamento com antibiótico (ATB), ou 20 dias após ATB.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção é baseada, em parte, nas seguintes descobertas: 1) IL-17R é expressado no nível mais alto sobre as superfícies basolaterais de células epiteliais respiratórias, 2) IL-17F é mais potente na estimulação de expressão de citocinas, quimiocinas, e/ou fatores de crescimento inflamatórios quando fornecida às células epiteliais respiratórias basolateralmente comparada quando é fornecida apicalmente, 3) indução mediada por IL-17F de citocinas, quimiocinas, e/ou fatores de crescimento é significativamente atenuada por um anticorpo anti-IL-17R inibitório, e 4) níveis de expressão de IL-17F correlacionam-se com o progresso da

inflamação das vias aéreas, e.g., em pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos. Estas descobertas confirmam fortemente um papel de IL-17F, e sua sinalização subseqüente por intermédio de IL-17R, em distúrbios inflamatórios do sistema respiratório.

Como tal, a presente invenção refere-se aos polipeptídeos e polinucleotídeos de IL-17F e IL-17R, e aos seus usos. Tais usos incluem, mas não são limitados à, geração de anticorpos específicos, que podem ser então usados em métodos de seleção de compostos de teste capazes de inibirem, i.e., diminuírem, limitarem, bloquearem, ou diferentemente reduzirem a ligação de IL-17F em IL-17R, métodos de monitoração dos níveis de expressão em uma amostra ou indivíduo (e.g., para diagnosticar, prognosticar, e/ou monitorar), e métodos de tratamento de inflamação das vias aéreas, e.g., em pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos.

Polinucleotídeos e polipeptídeos IL-17F e de IL-17R

Seqüências de aminoácido e de nucleotídeos de IL-17F são conhecidas na arte e são proporcionadas. A seqüência de nucleotídeos de Il-17F de humano é mostrada como SEQ ID NO:1. A seqüência de aminoácidos de Il-17F de comprimento total correspondendo à seqüência de nucleotídeos acima é mostrada como SEQ ID NO:2. A seqüência de aminoácidos de IL-17F madura corresponde a uma proteína começando a cerca de o aminoácido 31 de SEQ ID NO:2 (veja, e.g., Pedido de Patente U.S. de No. 10/102,080, aqui incorporado em sua totalidade como referência).

Seqüências de aminoácidos e de nucleotídeos de L-17R são conhecidas na arte e são proporcionadas. A seqüência de nucleotídeos de IL-17R de humano é mostrada como SEQ ID NO:3, que inclui uma cauda de poli(A). A seqüência de aminoácidos de proteína IL-17R de comprimento total correspondendo à seqüência de nucleotídeos acima é mostrada como

SEQ ID NO:4.

Os ácidos nucleicos relacionados com a presente invenção podem compreender DNA ou RNA e podem ser total ou parcialmente sintéticos. Referência a uma seqüência de nucleotídeos como aqui exibida inclui uma molécula de DNA com a seqüência especificada, e inclui uma molécula de RNA com a seqüência especificada na qual U substitui T, a não ser que o contexto requeira de outro modo.

Os polinucleotídeos isolados relacionados com a presente invenção podem ser usados como sondas de hibridização e iniciadores para identificar e isolar ácidos nucleicos possuindo seqüências idênticas ou similares àquelas codificadoras dos polinucleotídeos isolados. Métodos de hibridização para identificar e isolar ácidos nucleicos incluem reação em cadeia de polimerase (PCR), hibridizações de Southern, hibridização *in situ* e hibridização de Northern, e são bem conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte.

Reações de hibridização podem ser realizadas sob condições de estringência diferente. A estringência de uma reação de hibridização inclui a dificuldade com a qual quaisquer duas moléculas de ácido nucleico hibridizarão uma com a outra. Preferivelmente, cada polinucleotídeo de hibridização hibridiza com seu polinucleotídeo correspondente sob condições de estringência reduzida, com maior preferência condições estringentes, e mais preferivelmente condições elevadamente estringentes. Exemplos de condições de estringência são mostrados na Tabela 1 abaixo: condições elevadamente estringentes são aquelas que são pelo menos tão estringentes quanto, por exemplo, as condições A-F; condições estringentes são pelo menos tão estringentes quanto, por exemplo, as condições G-L; e condições de estringência reduzida são pelo menos tão estringentes quanto, por exemplo, as condições M-R.

Tabela 1. Condições de Estringência

Condição de estringência	Híbrido de polinu-cleotídeo	Comprim. do híbrido (bp) [1]	Temperatura de hibridização e tampão [2]	Temper. de lavagem e tampão [2]
A	DNA:DNA	> 50	65°C; 1xSSC -ou- 42°C; 1xSSC, 50% formamida	65°C; 0.3xSSC
B	DNA:DNA	<50	T_B*; 1xSSC	T_R*; 1xSSC
C	DNA:RNA	> 50	67°C; 1xSSC -ou- 45°C; 1xSSC, 50% formamida	67°C; 0.3xSSC
D	DNA:RNA	<50	T_D*; 1xSSC	T_D*; 1xSSC
E	RNA:RNA	>50	70°C; 1xSSC -ou- 50°C; 1xSSC, 50% formamida	70°C; 0.3xSSC
F	RNA:RNA	<50	T_F*; 1xSSC	T_F*; 1xSSC
G	DNA:DNA	> 50	65°C; 4xSSC -ou- 42°C; 4xSSC, 50% formamida	65°C; 1xSSC
H	DNA:DNA	<50	T_H*; 4xSSC	T_H*; 4xSSC
I	DNA:RNA	> 50	67°C; 4xSSC -ou- 45°C; 4xSSC, 50% formamida	67°C; 1xSSC
J	DNA:RNA	<50	T_J*; 4xSSC	T_J*; 4xSSC
K	RNA:RNA	> 50	70°C; 4xSSC -ou- 50°C; 4xSSC, 50% formamida	67°C; 1xSSC
L	RNA:RNA	<50	T_L*; 2xSSC	T_L*; 2xSSC
M	DNA:DNA	> 50	50°C; 4xSSC -ou- 40°C; 6xSSC, 50% formamida	50°C; 2xSSC
N	DNA:DNA	<50	T_N*; 6xSSC	T_N*; 6xSSC
O	DNA:RNA	> 50	55°C; 4xSSC -ou- 42°C; 6xSSC, 50% formamida	55°C; 2xSSC
P	DNA:RNA	<50	T_P*; 6xSSC	T_P*; 6xSSC
Q	RNA:RNA	> 50	60°C; 4xSSC -ou- 45°C; 6xSSC, 50% formamida	60°C; 2xSSC
R	RNA:RNA	<50	T_R*; 4xSSC	T_R*; 4xSSC

1: O comprimento do híbrido é aquele previsto para a(s) região(ões) hibridizada(s) dos polinucleotídeo de hibridização. Quando se hibridiza um polinucleotídeo em um polinucleotídeo alvo de seqüência desconhecida, o comprimento do híbrido é assumido como sendo aquele do polinucleotídeo de hibridização. Quando polinucleotídeos de seqüência desconhecida são hibridizados, o comprimento do híbrido pode ser determinado por alinhamento das seqüências dos polinucleotídeos e identificação da região ou das regiões de complementaridade de seqüência ótima.

2: SSPE (1xSSPE é NaCl 0,15 M, NaH_2PO_4 10 mM, e EDYA 1,25 mM, pH 7,4) pode ser substituinte de SSC (1xSSC é NaCl 0,15 M e citrato de sódio 15 mM) nos tampões de hibridização e de lavagem; lavagens são realizadas por 15 minutos após a completitude da hibridização.

T_B* - T_R*: A temperatura de hibridização para híbridos previstos como menores do que 50 pares de base em comprimento deve ser 5-10°C menor do que a temperatura de fusão (T_m) do híbrido, onde T_m é determinada de acordo com as seguintes equações. Para híbridos menores do que 18 pares de base em

comprimento, $T_m(°C) = 81,5 + 16,6(\log_{10}Na^+) + 0,41(\%G+C)-(600/N)$, onde N é o número de bases no híbrido, e Na^+ é a concentração de íons sódio no tampão de hibridização (Na^+ para 1xSSC = 0,165 M).

Exemplos adicionais de condições de estringência para hibridização de polinucleotídeo são proporcionados em Sambrook, J., E.F. Fritsch, e T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, capítulos 9 e 11, e Current Protocols in Molecular Biology, 1995, F.M. Ausubel et al., está disposta sobre., Jonh Wiley & Sons, Inc., seções 2.10 e 6.3-6.4, aqui incorporados como referências.

Os polinucleotídeos isolados relacionados com a presente invenção podem ser usados como iniciadores e sondas de hibridização para identificar e isolar DNA possuindo seqüências codificadoras de variantes alélicas dos polinucleotídeos descritos. Variantes alélicas são formas alternativas naturalmente ocorrentes dos polinucleotídeos descritos que codificam polipeptídeos que são idênticos aos ou possuem similaridade significativa com os polipeptídeos codificados pelos polinucleotídeos aqui descritos. Preferivelmente, variantes alélicas possuem pelo menos 90% de identidade de seqüência (mais preferivelmente, pelo menos 95% de identidade; mais preferivelmente, pelo menos 99% de identidade) com os polinucleotídeos descritos. Alternativamente, há similaridade significativa quando os segmentos de ácido nucleico hibridizarão sob condições de hibridização seletiva (e.g., condições de hibridização elevadamente estringentes) com os polinucleotídeos descritos.

Os polinucleotídeos isolados relacionados com a presente invenção também podem ser usados como iniciadores e sondas de hibridização para identificar e isolar DNAs possuindo seqüências codificadoras de polipeptídeo homólogas aos polinucleotídeos descritos. Estes homólogos são polinucleotídeos e polipeptídeos isolados de uma espécie

diferente daquela dos polinucleotídeos e polipeptídeos descritos, ou dentro da mesma espécie, mas com similaridade de seqüência significativa aos polipeptídeos e polinucleotídeos descritos. Preferivelmente, homólogos de polinucleotídeo possuem pelo menos 50% de identidade de seqüência (com maior preferência, pelo menos 75% de identidade; mais preferivelmente, pelo menos 90% de identidade) com os polinucleotídeos descritos, enquanto que os homólogos de polipeptídeo possuem pelo menos 30% de identidade de seqüência (com maior preferência, pelo menos 45% de identidade; mais preferivelmente, pelo menos 60% de identidade) com os polipeptídeos descritos. Preferivelmente, homólogos dos polipeptídeos e polinucleotídeos descritos são aqueles isolados de espécie de mamífero.

Cálculos de "homologia" ou de "identidade de seqüência" entre duas seqüências (os termos são aqui usados intercambiavelmente) são realizados como segue. As seqüências são alinhadas para propósitos de comparação ótima (e.g., lacunas podem ser introduzidas em uma ou em ambas de uma primeira e uma segunda seqüência de aminoácidos ou de ácido nucleico para alinhamento ótimo e seqüências não-homólogas podem ser desconsideradas para propósitos de comparação). Em uma modalidade preferida, o comprimento de uma seqüência de referência alinhada para propósitos de comparação é pelo menos 30%, preferivelmente pelo menos 40%, com maior preferência pelo menos 50%, com preferência ainda maior pelo menos 60%, e com preferência ainda maior pelo menos 70%, 80%, 90%, 100% do comprimento da seqüência de referência. Os resíduos de aminoácido ou nucleotídeos em posições de aminoácido ou em posições de nucleotídeo correspondentes são então comparados. Quando uma posição na primeira seqüência está ocupada por um resíduo de aminoácido ou nucleotídeo como a posição correspondente na segunda seqüência, então as moléculas são idênticas naquela posição (como aqui usado "identidade" de aminoácido ou de ácido nucleico é equivalente à "homologia" de aminoácido ou de ácido

nucleico). A identidade percentual entre as duas seqüências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas seqüências, levando-se em consideração o número de lacunas, e o comprimento de cada lacuna, que necessitam ser introduzidos para alinhamento ótimo das duas seqüências.

A comparação de seqüências e a determinação da identidade de seqüência percentual entre duas seqüências podem ser realizadas usando um algoritmo matemático. Em uma modalidade preferida, a identidade percentual entre duas seqüências de aminoácidos é determinada usando o algoritmo de Needleman e Wunsch ((1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-53), que tem sido incorporado no programa GAP no pacote de programas de computador GCG (disponível em www.gcg.com), usando quer uma matriz Blossum 62 quer uma matriz PAM250, e um peso de lacuna de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ou 4 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6. Em ainda outra modalidade preferida, a identidade percentual entre duas seqüências de nucleotídeos é determinada usado o programa GAP no pacote de programas de computador GCG (disponível www.gcg.com), usando uma matriz NWSgapdna.CMP e um peso de lacuna de 40, 50, 60, 70, ou 80 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6. Um conjunto de parâmetros particularmente preferidos (e um que deve ser usado se o praticante não tiver certeza quais parâmetros devem ser aplicados para determinar se uma molécula está dentro de uma limitação de homologia ou identidade de seqüência da invenção) é uma matriz de escore Blossum 62 com uma penalidade de lacuna de intervalo 12, uma penalidade de lacuna estendida de 4, e uma penalidade de lacuna de deslocamento de matriz de 5. A identidade percentual entre duas seqüências de aminoácidos ou de nucleotídeos também pode ser determinada usando o algoritmo de Meyers e Miller ((1989) CABIOS 4:11-17), que tem sido incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), usando uma tabela de resíduo de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de lacuna de 12 e uma penalidade de lacuna de 4.

Os polinucleotídeos isolados relacionados com a presente

invenção também podem ser usados como iniciadores e sondas de hibridização para identificar células e tecidos que expressam os polipeptídeos relacionados com a presente invenção e as condições sob as quais são expressados.

Adicionalmente, a função dos polipeptídeos relacionados com a presente invenção pode ser diretamente examinada pelo uso dos polinucleotídeos codificadores dos polipeptídeos para alterar (i.e., intensificar, reduzir, ou modificar) a expressão dos genes correspondendo aos polinucleotídeos relacionados com a presente invenção em uma célula ou em um organismo. Estes "genes correspondentes" são as seqüências de DNA genômico relacionadas com a presente invenção que são transcritas para produzir os mRNAs do qual os polinucleotídeos relacionados com a presente invenção são derivados.

Expressão alterada dos geles relacionados com a presente invenção pode ser realizada em uma célula ou em um organismo por meio do uso de vários polinucleotídeos inibitórios, tais como polinucleotídeos anti-sentido e ribozimas que se ligam em e/ou clivam o mRNA transcrito dos genes relacionados com a invenção (veja, e.g., Galderisi et al. (1999) *J. Cell Physiol.* 181:251-57; Sioud (2001) *Curr. Mol. Med.* 1:575-88). Um polinucleotídeo(s) inibitório(s), e.g., de IL-17F e/ou de IL-17R, pode(m) ser usado(s) como um antagonista, e.g., para inibir a ligação de IL-17F em IL-17R. Conseqüentemente, tais polinucleotídeos inibitórios podem ser úteis na prevenção ou no tratamento de distúrbios relacionados com ligação de IL-17F em IL-17R, e.g., inflamação das vias aéreas, e.g., em pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos.

Os polinucleotídeos anti-sentido ou ribozimas relacionados com a invenção podem ser complementares a uma fita codificadora inteira de um gene relacionado com a invenção, ou a uma sua porção. Alternativamente,

polinucleotídeos anti-sentido ou ribozimas podem ser complementares a uma região não-codificadora da fita codificadora de um gene relacionado com a invenção. Os polinucleotídeos anti-sentido ou ribozimas podem ser construídos usando síntese química e reações de ligação enzimáticas usando procedimentos bem conhecidos na arte. As ligações de nucleosídeo de polinucleotídeos quimicamente sintetizados podem ser modificadas para intensificar sua capacidade para resistir à degradação mediada por nuclease, bem como para aumentar a sua especificidade de seqüência. Tais modificações de ligação incluem, mas não são limitadas às, ligações fosforotioato, metilfosfonato, fosforoamidato, boranofosfato, morfolino, e ácido peptídeo-nucleico (PNA) (Galderisi et al.. *supra*; Heasman (2002) *Dev. Biol.* 243:209-14; Micklefreld (2001) *Curr. Med. Chem.* 8:1157-79). Alternativamente, estas moléculas podem ser produzidas biologicamente usando um vetor de expressão no qual um polinucleotídeo relacionado com a presente invenção tem sido subclonado em uma orientação anti-sentido (i.e., inversa).

Os polinucleotídeos inibitórios da presente invenção também incluem oligonucleotídeos de formação-triplex (TFOs) que se ligam na cavidade maior de DNA duplex DNA com especificidade e afinidade altas (Knauert e Glazer (2001) *Hum. Mol. Genet.* 10:2243-51). Expressão dos genes relacionados com a presente invenção pode ser inibida por TFOs selecionadores complementares às regiões regulatórias dos genes (i.e., as seqüências de promotor e/ou de intensificador) para formar estruturas de hélice tripla que previnem a transcrição dos genes.

Em uma modalidade da invenção, os polinucleotídeos inibitórios da presente invenção são moléculas de RNA interferente curto (siRNA). Estas moléculas de siRNA são curtas (preferivelmente 19-25 nucleotídeos; mais preferivelmente 19 ou 21 nucleotídeos), moléculas de RNA de fita dupla que causam degradação seqüência-específica de mRNA

alvo Esta degradação é conhecida como interferência de RNA (RNAi) (veja, e.g., Bass (2001) *Nature* 411:428-29). Originalmente identificada em organismos inferiores, RNAi tem sido efetivamente aplicada em células de mamífero e tem sido recentemente mostrado que previne hepatite fulminante em camundongos tratados com moléculas de siRNA selecionadas para Fas mRNA (Song et al. (2003) *Nature Med.* 9:347-51). Em adição, tem sido recentemente relatado que siRNA intratecalmente liberado bloqueia respostas de dor em dois modelos (modelo de dor induzida por agonista e modelo de dor neuropática) em rato (Dorn et al. (2004) *Nucleic Acids Res.* 32(5):e49).

As moléculas de siRNA da presente invenção podem ser geradas por anelamento de duas moléculas de RNA de fita única complementares juntas (uma das quais é compatível com uma porção de mRNA alvo) (Fire et al., Patente U.S. de No. 6.506,559) ou por meio do uso de uma única molécula de RNA grampo-de-cabelo que se dobra sobre si mesma para produzir a porção de fita dupla exigida (Yu et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:6047-52). As moléculas de siRNA podem ser quimicamente sintetizadas (Elbashir et al. (2001) *Nature* 411:494-98) ou produzidas por transcrição *in vitro* usando modelos de DNA de fita única (Yu et al., *supra*). Alternativamente, as moléculas de siRNA podem ser produzidas biologicamente, quer transientemente (Yu et al., *supra*; Sui et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5515-20) quer estavelmente (Paddison et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1443-48), usando um vetor(es) de expressão contendo seqüências de siRNA de senso e anti-sentido. Recentemente, redução de níveis de mRNA alvo em células primárias de humano, em uma maneira eficiente e seqüência-específica, foi demonstrada usando vetores adenovirais que expressam RNAs grampo-de-cabelo, que são adicionalmente processados em siRNAs (Arts et al. (2003) *Genome Res.* 13:2325-32).

As moléculas de siRNA selecionadas para os polinucleotídeos relacionados com a presente invenção podem ser planejadas baseando-se em

critérios bem conhecidos na arte (e.g., Elbashir et al. (2001) *EMBO J.* 20:6877-88). Por exemplo, o segmento alvo do mRNA alvo preferivelmente deve começar com AA (mais preferido), TA, GA, ou CA; a razão GC da molécula de siRNA deve ser preferivelmente de 45-55%; a molécula de siRNA preferivelmente não deve conter três dos mesmos nucleotídeos em uma fila; a molécula de siRNA preferivelmente não deve conter sete G/Cs misturadas em uma fila; e o segmento alvo preferivelmente deve estar na região de ORF do mRNA alvo e preferivelmente deve ser de pelo menos 75 pb após ATG de iniciação e de pelo menos 75 pb antes do códon de terminação. Baseando-se nestes critérios, ou em outros critérios conhecidos (e.g., Reynolds et al. (2004) *Nature Biotechnol.* 22:326-30), moléculas de siRNA relacionadas com a presente invenção que selecionam os polinucleotídeos de mRNA relacionados com a presente invenção podem ser planejadas por uma pessoa experiente na arte.

Expressão alterada dos genes relacionados com a presente invenção em um organismo também pode ser realizada por meio da criação de animais transgênicos não-humanos em cujos genomas polinucleotídeos relacionados com a presente invenção têm sido introduzidos. Tais animais transgênicos incluem animais que possuem cópias múltiplas de um gene (i.e., o transgene) da presente invenção. Uma seqüência(s) regulatória tecido-específica(s) pode(m) ser operacionalmente ligada(s) no transgene para dirigir a expressão de um polipeptídeo relacionado com a presente invenção para células particulares ou um estágio de desenvolvimento particular. Métodos de geração de animais transgênicos via manipulação e microinjeção de embrião, particularmente animais tais como camundongos, têm se tornado convencionais e são bem conhecidos na arte (e.g., Bockamp et al., *Physiol. Genomics*, 11:115-32 (2002)).

Expressão alterada dos genes relacionados com a presente invenção em um organismo também pode ser realizada por meio da criação de

animais cujos genes endógenos correspondentes aos polinucleotídeos relacionados com a presente invenção têm sido submetidos ao rompimento por meio da inserção de seqüências de polinucleotídeo estranhas (i.e., um animal nocauteado). A região codificadora do gene endógeno pode ser submetida ao rompimento, gerando deste modo uma proteína não funcional. Alternativamente, a região regulatória a montante do gene endógeno pode ser submetida ao rompimento ou substituída com elementos regulatórios diferentes, resultando na expressão alterada da proteína ainda-funcional. Métodos para gerar animais nocauteados incluem recombinação homóloga e são bem conhecidos na arte (e.g., Wolfer et al., *Trends Neurosci.*, 25:336-40 (2002)).

Os polinucleotídeos isolados da presente invenção também podem estar operacionalmente ligados em uma seqüência de controle de expressão e/ou ligados em um vetor de expressão para a produção recombinante dos polipeptídeos (incluindo os fragmentos ativos e/ou os polipeptídeos de fusão dos mesmos) relacionados com a presente invenção. Métodos gerais de expressar proteínas recombinantes são bem conhecidos na arte.

Um vetor de expressão, como aqui usado, é intencionado para se referir a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico no qual tem sido ligado. Um tipo de vetor é um plasmídeo, que se refere a uma alça de DNA de fita dupla circular na qual segmentos de DNA adicionais podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral, no qual segmentos de DNA adicionais podem ser ligados no genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira na qual são introduzidos (e.g., vetores bacterianos possuindo uma origem de replicação bacteriana e vetores episssomais de mamífero). Outros vetores (e.g., vetores não-episssomais de mamífero) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira sob introdução na célula hospedeira, e deste modo são

replicados juntamente com o genoma do hospedeiro. Ainda mais, certos vetores são capazes de dirigirem a expressão de genes nos quais estão operacionalmente ligados. Tais vetores são aqui referidos como vetores de expressão recombinantes (ou simplesmente, vetores de expressão). Em geral, vetores de expressão de utilidade em técnicas de DNA recombinante estão muitas vezes na forma de plasmídeos. No presente relatório descritivo, plasmídeo e vetor podem ser usados intercambiavelmente porque o plasmídeo é a forma mais comumente usada de vetor. Contudo, a invenção é intencionada para incluir outras formas de vetores de expressão, tais como vetores virais (e.g., vírus adeno-associados, adenovírus e retrovírus defectivos em replicação), que servem com funções equivalentes.

Em uma modalidade, os polinucleotídeos relacionados com a presente invenção são usados para criar agonistas de Il-17F recombinante, e.g. aqueles que podem ser identificados baseado na presença de pelo menos um "motivo ligante de receptor de IL-17F". Como aqui usado, o termo "motivo ligante de receptor de IL-17F" inclui resíduos ou seqüências de aminoácidos que são importantes para a ligação de IL-17F em seu receptor requisitado. Exemplos de um agonista de IL-17F incluem IL-17F recombinante, e/ou seus fragmentos, e.g., seus fragmentos de ligação em IL-17R. Em outra modalidade, os polinucleotídeos relacionados com a presente invenção são usados para criar antagonistas de IL-17F (e.g., polinucleotídeos inibitórios de IL-17R e/ou IL-17F; polipeptídeos IL-17R solúveis (incluindo seus fragmentos e/ou suas proteínas de fusão); anticorpos anti-IL-17F ou anti-IL-17R inibitórios; e/ou moléculas pequenas antagonísticas, etc.).

Métodos de criar polipeptídeos de fusão, i.e., um primeiro grupo de polipeptídeo ligado em um segundo grupo de polipeptídeo, são bem conhecidos na arte. Por exemplo, um polipeptídeo IL-17F ou polipeptídeo IL-17R, incluindo seus fragmentos, pode ser fusionado em um segundo grupo de polipeptídeo, e.g., uma imunoglobulina ou um seu fragmento (e.g., um

fragmento de ligação-Fc da mesma). Em algumas modalidades, o primeiro grupo de polipeptídeo inclui, e.g., polipeptídeo IL-17R ou de IL-17F de comprimento total. Alternativamente, o primeiro polipeptídeo pode compreender menos do que o polipeptídeo IL-17R ou de IL-17F de comprimento total. Adicionalmente, formas solúveis de, e.g., IL-17F ou IL-17R podem ser fusionadas por meio de seqüências "*linker*" na porção Fc de uma imunoglobulina. Outras proteínas de fusão, tais como aquelas incorporando glutationa-S-transferase (GST), Lex-A, tiorredoxina (TRX) ou proteína ligante de maltose (MBP), também podem ser usadas.

O segundo grupo de polipeptídeo é preferivelmente solúvel. Em algumas modalidades, o segundo grupo de polipeptídeo intensifica a meia-vida, (e.g., a meia-vida em soro) do polipeptídeo ligado. Em algumas modalidades, o segundo grupo de polipeptídeo inclui uma seqüência que facilita a associação do polipeptídeo de fusão com um segundo polipeptídeo IL-17F ou IL-17R. Em modalidades preferidas, o segundo polipeptídeo inclui pelo menos uma região de um polipeptídeo de imunoglobulina. Polipeptídeos de fusão de imunoglobulina são conhecidos na arte e são descritos em, e.g., Patentes U.S. de Nos. 5.516.964; 5.225.538; 5.428.130; 5.514.582; 5.714.147; e 5.455.165, todas as quais são por meio deste aqui incorporados como referências. As proteínas de fusão podem incluir adicionalmente uma seqüência *linker* unindo o primeiro grupo de polipeptídeo, e.g., IL-17F ou IL-17R, incluindo seus fragmentos, no segundo grupo. Uso de tais seqüências *linker* é bem conhecido na arte. Por exemplo, a proteína de fusão pode incluir um *linker* peptídico, e.g., um *linker* peptídico de cerca de 2 a 20, com maior preferência menor do que 10, aminoácidos em comprimento. Em uma modalidade, o *linker* peptídico pode ser de 2 aminoácidos em comprimento.

Em outra modalidade, a proteína recombinante inclui uma seqüência de sinal heteróloga (i.e., uma seqüência de polipeptídeo que não está presente em um polipeptídeo codificado por um ácido nucleico

codificador de IL-17F ou IL-17R) em sua terminação-N. Por exemplo, uma seqüência de sinal de outra proteína pode ser fusionada em um polipeptídeo IL-17F ou IL-17Re, incluindo seus fragmentos e/ou suas proteínas de fusão. Em certas células hospedeiras (e.g., células hospedeiras de mamífero), expressão e/ou secreção de proteínas recombinantes podem ser aumentadas por meio do uso de uma seqüência de sinal heteróloga. Um peptídeo de sinal que pode ser incluído na proteína de fusão é o peptídeo de sinal de melitina MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (SEQ ID NO:5).

Uma proteína de fusão da invenção pode ser produzida por técnicas de DNA recombinante padrão. Por exemplo, fragmentos de DNA codificadores de seqüências de polipeptídeo diferentes são ligados juntos em matriz de acordo com técnicas convencionais pelo emprego de, e.g., terminações de extremidade cega ou de extremidade atordoada para ligação, digestão por enzima de restrição para proporcionar terminações apropriadas, preenchimento de extremidades coesivas conforme apropriado, tratamento por fosfatase alcalina para evitar junção indesejável, e ligação enzimática. Em outra modalidade, o gene de fusão pode ser sintetizado por técnicas convencionais incluindo sintetizadores de DNA automáticos. Alternativamente, amplificação por PCR de fragmentos de gene pode ser realizada usando iniciadores de âncora que ocasionam saliências complementares entre dois fragmentos de gene consecutivos que podem ser subseqüentemente anelados e reamplificados para gerar uma seqüência de gene quimérica (veja, por exemplo, Ausubel et al. (Eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Ainda mais, muitos vetores de expressão estão comercialmente disponíveis os quais codificam um grupo de fusão (e.g., uma região Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina). Um ácido nucleico codificador de IL-17F ou de IL-17R pode ser clonado em um tal vetor de expressão de tal modo que a proteína de fusão seja ligada em matriz na proteína imunoglobulina. Em algumas

modalidades, polipeptídeos de fusão de IL-17F ou de IL-17R existem como oligômeros, tais como dímeros ou trímeros.

Os vetores de expressão recombinantes da invenção podem transportar seqüências adicionais, tais como seqüências que regulam a replicação do vetor em células hospedeiras (e.g., origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a seleção das células hospedeiras nas quais o vetor tem sido introduzido. Por exemplo, tipicamente o gene marcador selecionável confere resistência a drogas, tais como G418, higromicina ou metotrexato, à uma célula hospedeira na qual o vetor tem sido introduzido. Genes marcadores selecionáveis preferidos incluem o gene de diidrofolato-redutase (DHFR) (para uso em células hospedeiras dhfr- com amplificação/seleção de metotrexato) e o gene neo (para seleção de G418).

Vetores adequados podem ser escolhidos ou construídos, contendo seqüências regulatórias apropriadas, incluindo seqüências de promotor, seqüências de terminador, seqüências de poliadenilação, seqüências de intensificador, genes marcadores e outras seqüências, e.g., seqüências que regulam a replicação do vetor nas células hospedeiras, (e.g., origem de replicação) conforme apropriado. Vetores podem ser plasmídeos ou virais, e.g., fago, ou fagomídeo, conforme apropriado. Para outros detalhes veja, por exemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2nd ed., Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Muitas técnicas e protocolos conhecidos para a manufatura de ácido nucleico, por exemplo, na preparação de construtos de ácido nucleico, mutagênese, seqüenciamento, introdução de DNA em células e expressão de gene, e análise de proteínas, são descritas em detalhe em Current Protocols in Molecular Biology, 2nd ed., Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.

Assim, um outro aspecto da presente invenção proporciona uma célula hospedeira compreendendo um ácido nucleico como aqui descrito.

Ainda um outro aspecto proporciona um método compreendendo introdução de tal ácido nucleico em uma célula hospedeira. A introdução pode empregar qualquer técnica disponível. Para células eucarióticas, técnicas adequadas podem incluir transfecção em fosfato de cálcio, DEAE-Dextrana, eletroporação, transfecção mediada por lipossoma, e transdução usando retrovírus ou outros vírus, e.g., vacínia ou, para células de inseto, baculovírus. Para células bacterianas, técnicas adequadas podem incluir transformação em cloreto de cálcio, eletroporação e transfecção usando bacteriófago. A introdução pode ser seguida por causa ou permissão da expressão do ácido nucleico, e.g., por cultura de células hospedeiras sob condições para expressão do gene.

Numerosas linhagens celulares podem atuar como células hospedeiras adequadas para expressão recombinante dos polipeptídeos relacionados com a presente invenção. Linhagens de células hospedeiras de mamífero incluem, por exemplo, células COS, células CHO, células 293, células A431, células 3T3, células CV-1, células HeLa, células L, células BHK21, células HL-60, células U937, células HaK, células Jurkat, vem como cepas de célula derivadas de cultura *in vitro* de tecido primário ou de explantes primários.

Alternativamente, deve ser possível produzir recombinantemente os polipeptídeos relacionados com a presente invenção em eucariotos inferiores, tais como leveduras, ou em procariotos. Cepas de levedura potencialmente adequadas incluem *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas de *Kluyveromyces*, e cepas de *Candida*. Cepas de bactéria potencialmente adequadas incluem *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, e *Salmonella typhimurium*. Se os polipeptídeos relacionados com a presente invenção forem preparados em levedura ou bactérias, pode ser necessário modificá-los, por exemplo, por fosforilação ou glicosilação de sítios apropriados, com o objetivo de obter funcionalidade. Tais ligações

covalentes podem ser realizadas usando métodos enzimáticos ou químicos bem conhecidos.

Expressão em bactérias podem resultar na formação de corpos de inclusão incorporando a proteína recombinante. Assim, redobramento da proteína recombinante pode ser requerida com o propósito de produzir material ativo ou mais ativo. Vários métodos para obtenção de proteínas heterólogas corretamente dobradas dos corpos de infusão bacterianos são conhecidos na arte. Estes métodos geralmente envolvem solubilização da proteína dos corpos de inclusão, então desnaturação da proteína completamente usando um agente caotrópico. Quando resíduos de cisteína estiverem presentes na seqüência de aminoácidos primária da proteína, muitas vezes é necessário realizar o redobramento em um ambiente que permite a formação correta de ligações de dissulfeto (um sistema redox). Métodos gerais de redobramento são descritos em Kohno (1990) *Meth. Enzymol.* 185:187-95. EP 0433225, e Patente U.S. de No. 5.399.677 descreve outros métodos apropriados.

Os polipeptídeos relacionados com a presente invenção também podem ser recombinantemente produzidos por ligação operacional dos polinucleotídeos isolados da presente invenção em seqüências de controle adequadas em um ou mais vetores de expressão de inseto, tais como vetores de baculovírus, e emprego de um sistema de expressão de célula de inseto. Materiais e métodos para sistemas de expressão de baculovírus/Sf9 estão comercialmente disponíveis na forma de kit (e.g., o MaxBac® kit, Invitrogen, Carlsbad, CA).

Após a expressão recombinante nas células hospedeiras apropriadas, os polipeptídeos recombinantes da presente invenção podem ser então purificados do meio de cultura ou de extratos celulares usando processos de purificação conhecidos, tais como filtração em gel e cromatografia de troca iônica. Por exemplo, proteína IL-17F ou IL-17R

(incluindo seus fragmentos e/ou suas proteínas de fusão) pode ser purificada do meio condicionado. Formas ligadas em membrana de, e.g., IL-17R, podem ser purificadas por preparação de uma fração de membrana total da célula que expressa e extração das membranas com um detergente não-iônico tal como Triton X-100. Um polipeptídeo relacionado com a presente invenção pode ser concentrado usando um filtro de concentração de proteína comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Após a etapa de concentração, o concentrado pode ser aplicado em uma matriz de purificação tal como um meio de filtração em gel. Alternativamente, uma resina de troca aniônica pode ser empregada, por exemplo, uma matriz ou substrato possuindo grupos pendentes de dietil-amino-etila (DEAF) ou de polietilenoimina (PEI). As matrizes podem ser acrilamida, agarose, dextrana, celulose ou outros tipos comumente empregados em purificação de proteína. Alternativamente, uma etapa de troca catiônica pode ser empregada. Trocadores de cátion adequados incluem várias matrizes insolúveis compreendendo grupos sulfo-propila ou carbóxi-metila. Grupos sulfo-propila são preferidos (e.g., colunas S-Sepharose®). A purificação de proteínas recombinantes do sobrenadante de cultura também pode incluir uma ou mais etapas de coluna sobre tais resinas de afinidade como concanavalina A-agarose, heparina-TOYOPEARL® (Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd., Japão) ou Cibacrom blue 3GA Sepharose®; ou por cromatografia de interação hidrofóbica usando tais resinas como fenil, éter, butil-éter, ou propil-éter; ou por cromatografia de imunoafinidade. Finalmente, uma ou mais etapas de cromatografia líquida de desempenho alto de fase reversa (RP-HPLC) envolvendo o meio de RP-HPLC hidrofóbico, e.g., gel de sílica possuindo grupos metila ou outros grupos alifáticos pendentes, podem ser empregadas para adicionalmente purificar a proteína recombinante. Colunas de afinidade incluindo anticorpos (e.g., aqueles descritos usando os métodos aqui) para a proteína recombinante também

podem ser usadas na purificação de acordo com métodos conhecidos. Algumas ou todas as etapas de purificação acima, em várias combinações ou com outros métodos conhecidos, também podem ser empregadas para proporcionar uma proteína recombinante isolada substancialmente purificada. Preferivelmente, a proteína recombinante isolada é purificada de modo que esteja substancialmente livre de outras proteínas do mamífero. Adicionalmente, estes processos de purificação também podem ser usados para purificar os polipeptídeos da presente invenção de outras fontes, incluindo fontes naturais. Por exemplo, polipeptídeos relacionados com a invenção, e.g. polipeptídeos IL-17F ou IL-17R (incluindo seus fragmentos e/ou suas proteínas de fusão), que são expressados como um produto de animais transgênicos, e.g. vacas, cabras, porcos, ou ovelhas transgênicas, podem ser purificados como descrito acima.

Alternativamente, os polipeptídeos também podem ser recombinantemente expressados em uma forma que facilita a purificação. Por exemplo, os polipeptídeos podem ser expressados como fusões com proteínas tais como proteína ligante de maltose (MBP), glutationa-S-transferase (GST), ou tioredoxina (TRX). Kits para expressão e purificação de tais proteínas de fusão estão comercialmente disponíveis em New England BioLabs (Beverly, MA), Pharmacia (Piscataway, NJ), e Invitrogen, respectivamente. Proteínas recombinantes também podem ser marcadas com um epítopo pequeno e subseqüentemente identificadas ou purificadas usando um anticorpo específico para o epítopo. Um epítopo preferido é o epítopo FLAg, que está comercialmente disponível na Eastman Kodak (New Haven, CT).

Os polipeptídeos relacionados com a presente invenção também podem ser produzidos por síntese química convencional conhecida. Métodos para a síntese química de tais polipeptídeos são bem conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte. Tais polipeptídeos quimicamente sintéticos podem possuir propriedades biológicas em comum com os

polipeptídeos naturais, purificados, e assim podem ser empregados como substitutos biologicamente ativos ou imunológicos dos polipeptídeos naturais.

Os polipeptídeos relacionados com a presente invenção também incluem moléculas que são estruturalmente diferentes dos polipeptídeos descritos (e.g., possuem uma seqüência ligeiramente alterada0, mas possuem substancialmente as mesmas propriedades bioquímicas que as dos polipeptídeos descritos (e.g., são mudados apenas em resíduos de aminoácido funcionalmente não-essencial). Tais moléculas incluem variantes alélicas naturalmente ocorrentes e variantes deliberadamente engenhadas contendo alterações, substituições, reposições, inserções, ou deleções. Técnicas para tais alterações, substituições, reposições, inserções, ou deleções são bem conhecidas por aquelas pessoas experientes na arte. Em algumas modalidades, o grupo de polipeptídeo é proporcionado como um polipeptídeo variante possuindo mutações na seqüência naturalmente ocorrente (de tipo selvagem) que resulta em uma seqüência mais resistente à proteólise (relativa à seqüência não mutada).

Polipeptídeos IL-17F ou IL-17R, e seus fragmentos e/ou polipeptídeos de fusão, podem ser usados para selecionar agentes que são capazes de se ligarem em IL-17F e/ou de inibirem bioatividade de IKL-17F, i.e., agentes antagonísticos. Tais antagonistas, e.g., polinucleotídeos inibitórios, polipeptídeos (incluindo seus fragmentos e suas proteínas de fusão), anticorpos, e compostos pequenos, etc., podem inibir a bioatividade de IL-17F,e.g., por inibição da ligação de IL-17F em IL-17R. Ensaios de ligação utilizando uma proteína ligante desejada, imobilizada ou não, são bem conhecidos na arte e podem ser usados para este propósito com os polipeptídeos relacionados com a presente invenção, incluindo IL-17R. Ensaios de seleção (livres de células) baseados em proteína ou baseados em célula purificada podem ser usados para identificar tais agentes. Por exemplo, a proteína IL-17F pode ser imobilizada na forma purificada em um carreador

e ligação de ligantes potenciais em IL-17F purificada pode ser medida.

Anticorpos

Os inventores usaram anticorpos anti-IL-17F (i.e., anticorpos intactos e seus fragmentos ligantes de antígeno) que especificamente se ligam em IL-17F para detectar IL-17F em amostras de saliva coletadas de pacientes com fibrose cística que também sofriam de exacerbação pulmonar. Adicionalmente, os inventores usaram um anticorpo monoclonal específico para IL-17R para antagonizar produção de citocinas inflamatórias mediada por IL-17F (e.g., GRO-α e G-CSF). Assim, em uma modalidade da invenção, anticorpos anti-IL-17F ou anti-IL-17R antagonísticos podem ser úteis no diagnóstico, no prognóstico, na monitoração e/ou no tratamento de distúrbios relacionados com IL-17F, e.g., inflamação das vias aéreas, e.g., em pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos. Os anticorpos podem ser anticorpos de humano, humanizados, quiméricos, ou gerados *in vitro*.

Uma pessoa experiente na arte reconhecerá que, como aqui usado, o termo "anticorpo" refere-se a uma proteína compreendendo pelo menos uma, e preferivelmente duas, regiões variáveis de cadeia pesada (H) (abreviada aqui como VH), e pelo menos uma e preferivelmente duas regiões variáveis de cadeia leve (L) (abreviada aqui como VL). As regiões VH e VL podem ser adicionalmente divididas em regiões de hipervariabilidade, chamadas de "regiões de determinação de complementaridade" ("CDRs") entremeadas com regiões que estão mais conservadas, chamadas "regiões de molde" ("FRs"). A extensão das FRs e CDRs tem sido precisamente definida (veja, Kabat et al. (1991) "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Quinta Edição, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; e Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-17, que são por meio deste aqui incorporadas como referências). Cada VH e VL é composta de três CDRs e quatro FRs, arranjadas da terminação-amino para a

terminação-carboxila na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

O anticorpo pode adicionalmente incluir uma região constante de cadeias pesada e leve para deste modo formar uma cadeia de imunoglobulina pesada e leve, respectivamente. Em uma modalidade, o anticorpo é um tetrâmero de duas cadeias pesadas de imunoglobulina e duas cadeias leves de imunoglobulina, no qual as cadeias leve e pesada de imunoglobulina são interconectadas, e.g., por ligações de dissulfeto. A região constante de cadeia pesada é compreendida de três domínios, CH1, CH2 e CH3. A região constante de cadeia leve é compreendida de um domínio, CL. A região variável das cadeias pesadas e leves contém um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos tipicamente medeiam a ligação do anticorpo em tecidos ou fatores do hospedeiro, incluindo várias células do sistema imune (e.g., células efetoras) e os primeiro componente (Clq) do sistema de complemento clássico.

Imunoglobulina refere-se a uma proteína consistindo de um ou mais polipeptídeos substancialmente codificados pelos genes de imunoglobulina. Os genes de imunoglobulina de humano reconhecidos incluem os genes de região constante kappa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gama (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, épsilon e mu, bem como a miríade de genes de região variável de imunoglobulina. "Cadeias leves" de imunoglobulina de comprimento total (cerca de 25 Kd, ou 214 aminoácidos) são codificadas por um gene de região variável na terminação-NH_2 (cerca de 110 aminoácidos) e um gene de região constante kappa ou lambda na terminação-COOH. As "cadeias pesadas" de imunoglobulina de comprimento total (cerca de 50 Kd, ou 446 aminoácidos), são similarmente codificadas por um gene de região variável (cerca de 116 aminoácidos) e um dos outros genes de região constante acima mencionados, e.g., gama (codificando cerca de 330 aminoácidos). Os genes de região constante de cadeia pesada de

imunoglobulina codificam a classe de anticorpos, i.e., isótipo (e.g., IgM ou IgG1). O fragmento ligante em antígeno de um anticorpo (ou simplesmente "porção de anticorpo", ou "fragmento"), como aqui usado, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo de comprimento total que retêm a capacidade de especificamente se ligarem em um antígeno (e.g., CD3). Exemplos de fragmentos ligantes incluídos dentro do termo "fragmento ligante em antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo de domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ligação de dissulfeto na região de dobradiça; (iii) e um fragmento Fd consistindo dos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv consistindo dos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward et al. (1989) *Nature* 341:544-46), que consiste de um domínio VH; e (vi) uma região determinante de complementaridade (CDR) isolada. Em adição, embora os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, sejam codificados por genes separados, podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um *linker* sintético que permite que sejam preparados como uma única cadeia de proteína na qual as regiões VL e VH pareiam para formarem moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia única (scFv); veja, e.g., Bird et al. (1988) *Science* 242:423-26; e Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83). Também é intencionado que tais anticorpos de cadeia única sejam incluídos dentro do termo "fragmento ligante em antígeno" de um anticorpo. Estes fragmentos de anticorpo são obtidos usando técnicas convencionais conhecidas por aquelas pessoas experientes na arte, e os fragmentos são selecionados para utilidade na mesma maneira que o são os anticorpos intactos.

Moléculas de anticorpo para os polipeptídeos da presente invenção, e.g., anticorpos para IL-17F ou IL-17R, podem ser produzidas por métodos bem conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte. Por

exemplo, anticorpos monoclonais podem ser produzidos pela geração de hibridomas de acordo com métodos conhecidos. Hibridomas formados nesta maneira são então selecionados usando métodos padrão, tal como ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), para identificar um ou mais hibridomas que produzem um anticorpo que especificamente se liga nos polipeptídeos da presente invenção. Por exemplo, proteínas IL-17F da invenção podem ser usadas para imunizar animais para obter anticorpos monoclonais e policlonais que reagem com a proteína IL-17F. Similarmente, proteínas IL-17R podem ser usadas para obter anticorpos monoclonais e policlonais que especificamente reagem com IL-17R. Os imunogenes de peptídeo adicionalmente podem conter um resíduo de cisteína na terminação carboxila, e podem ser conjugados em um hapteno tal como hemocianina de lapa buraco de fechadura (KLH). Imunogenes de peptídeo adicionais podem ser gerados por substituição de resíduos de tirosina por resíduos de tirosina sulfatada. Métodos para sintetizar tais peptídeos são bem conhecidos na arte, por exemplo, como em Merrifreld (1963) *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-54; Krstenansky et al. (1987) *FEBS Lett.* 211:10. Um polipeptídeo de comprimento total da presente invenção pode ser usado como o imunogene, ou, alternativamente, fragmentos de peptídeo antigênicos dos polipeptídeos podem ser usados. Um peptídeo antigênico de um polipeptídeo da presente invenção compreende pelo menos 7 resíduos de aminoácido contínuos e inclui um epítopo tal que um anticorpo produzido contra o peptídeo forma um complexo imune específico com o polipeptídeo. Preferivelmente, o peptídeo antigênico compreende pelo menos 10 resíduos de aminoácido, com maior preferência pelo menos 15 resíduos de aminoácido, com preferência ainda maior pelo menos 20 resíduos de aminoácido, e mais preferivelmente pelo menos 30 resíduos de aminoácido.

Anticorpos monoclonais podem ser gerados por outros métodos conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte de tecnologia de

DNA recombinante. Como uma alternativa à preparação de hibridomas selecionadores de anticorpo monoclonal, um anticorpo monoclonal para um polipeptídeo da presente invenção pode ser identificado e isolado por seleção de uma biblioteca de imunoglobulina combinatória recombinante (e.g., uma biblioteca de exibição de fago de anticorpo) com um polipeptídeo relacionado com a presente invenção (e.g., IL-17F ou IL-17R) para deste modo isolar os membros da biblioteca de imunoglobulina que se ligam nos polipeptídeos relacionados com a presente invenção. Técnicas e kits comercialmente disponíveis para gerar e selecionar bibliotecas de exibição de fago são bem conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte. Em adição, exemplos de métodos e reagentes particularmente tratáveis para o uso em geração e seleção de bibliotecas de exibição de fago podem ser encontrados na literatura. Por exemplo, o método de "exibição de anticorpo combinatória" é bem conhecido e foi desenvolvido para identificar e isolar fragmentos de anticorpo possuindo uma especificidade por antígeno particular, e podem ser utilizados para produzir anticorpos monoclonais (para descrições de exibição de anticorpo combinatória, veja, e.g., Sastry et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5728; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275; Orlandi et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833). Após imunização de um animal com um imunogene como descrito acima, o repertório de anticorpos da coleção de células-B resultantes é clonado. Métodos são geralmente conhecidos para obtenção da seqüência de DNA de regiões variáveis de uma população diversa de moléculas de imunoglobulina pelo uso de uma mistura de iniciadores oligoméricos e PCR. Por exemplo, iniciadores de oligonucleotídeo mistos correspondendo às seqüências líder 5' (peptídeo de sinal) e/ou seqüências de molde 1 (FR1), bem como iniciadores para uma região constante 3' conservada, podem ser usados para amplificação por PCR das regiões variáveis de cadeias leve e pesada de numerosos anticorpos de murino (Larrick et al. (1991) *Biotechniques* 11:152-56). Uma estratégia similar

também tem sido usada para amplificar as regiões variáveis de cadeias pesada e leve de humano (Larrick et al. (1991) *Methods: Companion to Methods in Enzymology* 2:106-10).

Anticorpos e soros policlonais podem ser produzidos por imunização de um indivíduo adequado com um polipeptídeo da presente invenção. O título de anticorpo no indivíduo imunizado pode ser monitorado durante o tempo por técnicas padrão, tal como com ELISA usando proteína imobilizada. Se desejado, as moléculas de anticorpo direcionadas contra um polipeptídeo da presente invenção podem ser isoladas do indivíduo ou de meio de cultura e adicionalmente purificadas por técnicas bem conhecidas, tal como cromatografia de proteína A, para obter uma fração de IgG.

Fragmentos de anticorpos para os polipeptídeos da presente invenção podem ser produzidos por clivagem dos anticorpos de acordo com métodos bem conhecidos na arte. Por exemplo, fragmentos Fab e $F(ab')_2$ imunologicamente ativos podem ser gerados por tratamento dos anticorpos com uma enzima tal como pepsina.

Anticorpos de humano podem ser adicionalmente produzidos usando animais não-humanos transgênicos que são modificados de modo a produzirem anticorpos totalmente de humano em vez de anticorpos endógenos de animal em resposta ao desafio por um antígeno (veja, e.g., Publicação PCT WO 94/02602). Os genes endógenos codificadores de cadeias pesada e leve de imunoglobulina no hospedeiro não-humano têm sido incapacitados, e os loci ativos codificadores de imunoglobulinas de cadeias pesada e leve de humano são inseridos no genoma do hospedeiro. Os genes de humano são incorporados, por exemplo, usando cromossomos artificiais de levedura contendo os segmentos de DNA de humano requisitados. Um anima que proporciona todas as modificações desejadas é então obtido como progênie por cruzamento de animais transgênicos intermediários contendo menos do que o complemento total das modificações. A modalidade preferida

de um tal animal não-humano é um camundongo, e é chamado de XENOMOUSE como descritos em publicações PCT WO 96/33735 e WO 96/34096. Este animal produz células B que secretam imunoglobulinas totalmente humanas. Os anticorpos podem ser obtidos diretamente do animal após imunização com um imunogene de interesse, como, por exemplo, uma preparação de um anticorpo policlonal, ou alternativamente das células B imortalizadas derivadas do animal, tais como hibridomas produtores de anticorpos monoclonais. Adicionalmente, os genes codificadores de imunoglobulina com regiões variáveis de humano podem ser recuperados e expressados para obter diretamente os anticorpos, ou podem ser adicionalmente modificados para obter análogos tais como, por exemplo, moléculas de Fv de cadeia única.

Adicionalmente, anticorpos de cadeia única, quiméricos, e humanizados para os polipeptídeos da presente invenção, compreendendo ambas as porções humanas e não-humanas, podem ser produzidos usando técnicas de DNA recombinante padrão e/ou biblioteca de imunoglobulina combinatória recombinante. Anticorpos humanizados também podem ser produzidos usando camundongos transgênicos que são incapazes de expressarem genes de cadeias leve e pesada de imunoglobulina endógenos, mas que podem expressar genes de cadeias leve e pesada de humano. Por exemplo, anticorpos monoclonais (mAbs) de humano, e.g., mAb direcionados contra IL-17F, podem ser gerados usando camundongos transgênicos trazendo os genes de uma imunoglobulina de humano em vez de genes de imunoglobulina de murino. Esplenócitos destes camundongos transgênicos imunizados com o antígeno de interesse podem ser então usados para produzir hibridomas que secretam mAbs de humano com afinidades específicas por epítopos de uma proteína de humano (veja, e.g., Wood et al., Pedido Internacional de No. WO 91/00906; Kucherlapati et al., WO 91/10741; Lonberg et al. WO 92/03918; Kay et al., WO 92/03917; Lonberg et al. (1994)

Nature 368:856-59; Green et al. (1994) *Nat. Genet.* 7:13-21; Morrison et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-55; Bruggeman (1993) *Year Immunol* 7:33-40; Tuaillon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-24; Bruggeman et al. (1991) *Eur. J. Immunol.* 21:1323-26).

Anticorpos quiméricos, incluindo cadeias de imunoglobulina quimérica, podem ser produzidos por técnicas de DNA recombinante conhecidas na arte. Por exemplo, um gene codificador de região constante Fc de uma molécula de anticorpo monoclonal de murino (ou de outra espécie) é digerido com enzimas de restrição para remover a região codificadora de Fc de murino, e a porção equivalente de um gene codificador de uma região constante Fc de humano é substituída (veja Robinson et al., Pedido de Patente Internacional International PCT/US86/02269; Akira et al., Pedido de Patente Internacional 184.187; Taniguchi, Pedido de Patente Européia 171.496; Morrison et al., Pedido de Patente Européia 173.494; Neuberger et al., WO 86/01533; Cabilly et al., Patente U.S. de No. 4.816.567; Cabilly et al., Pedido de Patente Européia 125.023; Better et al. (1988) *Science* 240:1041-43; Liu et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-43; Liu et al. (1987) *J. Immunol.* 139:3521-26; Sun et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-18; Nishimura et al. (1987) *Cancer Res.* 47:999-1005; Wood et al. (1985) *Nature* 314:446-49; e Shaw et al. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-59).

Um anticorpo ou uma cadeia de imunoglobulina pode ser humanizado(a) por métodos conhecidos na arte. Anticorpos humanizados, incluindo cadeias de imunoglobulina humanizadas, podem ser gerados por substituição de seqüências da região variável Fv que não estão diretamente envolvidas em ligação de antígeno por seqüências equivalentes das regiões variáveis Fv. Métodos gerais para geração de anticorpos humanizados são proporcionados por Morrison (1985) *Science* 229:1202-07; Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4:214; Queen et al., Patentes U.S. de Nos. 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762, cujos conteúdos são por meio deste aqui incorporados

como referências. Aqueles métodos incluem isolamento, manipulação, e expressão de seqüências de ácido nucleico que codificam todas ou parte das regiões variáveis Fv de imunoglobulina de pelo menos uma cadeia pesada ou leve. Fontes de tais seqüências de ácido nucleico são bem conhecidas por aquelas pessoas experientes na arte, por exemplo, podem ser obtidas de um hibridoma produtor de um anticorpo contra um alvo predeterminado. O DNA recombinante codificador de anticorpo humanizado, ou um seu fragmento, então pode ser clonado em um vetor de expressão apropriado.

Imunoglobulinas ou moléculas de anticorpo enxertadas em CDR ou humanizadas podem ser produzidas por enxerto de CDR ou substituição de CDR, nas quais uma, duas, ou todas as CDRs de uma cadeia de imunoglobulina podem ser substituídas. Veja, e.g., Patente U.S. de No. 5.225.539; Jones et al. (1986) *Nature* 321:552-25; Verhoeyan et al. (1988) *Science* 239:1534; Beidler et al. (1988) *J. Immunol.* 141:4053-60; Winter, Patente U.S. de No. 5.225.539, cujos conteúdos são por meio deste aqui incorporados como referências. Winter descreve um método de enxerto de CDR que pode ser usado para preparar os anticorpos humanizados da presente invenção (Pedido de Patente UK GB 2188638A; Winter, Patente U.S. de No. 5.225.539), cujos conteúdos são por meio deste aqui incorporados como referências. Todas as CDRs de um anticorpo de humano particular podem ser substituídas por pelo menos uma porção de uma CDR de não-humano, ou apenas algumas das CDRs podem ser substituídas por CDRs de não-humano. Apenas é necessário substituir o número de CDRs requeridas para a ligação do anticorpo humanizado em um antígeno predeterminado.

Anticorpos monoclonais, quiméricos e humanizados que têm sido modificados, e.g., por deleção, adição, ou substituição de outras porções do anticorpo, e.g., a região constante, também estão dentro do escopo da invenção. Como exemplos não limitantes, um anticorpo pode ser modificado por deleção da região constante, por substituição da região constante por outra

região constante, e.g., uma região constante significa aumento da meia-vida, estabilidade, ou afinidade do anticorpo, ou uma região constante de outra espécie ou classe de anticorpo, e por modificação de um ou mais aminoácidos na região constante para alterar, por exemplo, o número de sítios de glicosilação, função de célula efetora, ligação de receptor de Fc (FcR), fixação de complemento, etc. Métodos para alterar uma região constante de anticorpo são conhecidos na arte. Anticorpos com função alterada, e.g. afinidade alterada por um ligante efetor, tal como FcR sobre uma célula, ou o componente C1 de complemento, podem ser produzidos por substituição de pelo menos um resíduo de aminoácido na porção constante do anticorpo por um resíduo diferente (veja, e.g., EP 388.151 Al, Patentes U.S. de Nos. 5.624.821 e 5.648.260, cujos todos conteúdos são por meio deste aqui incorporados como referências). Tipos similares de alterações em imunoglobulina de murino (ou de outras espécies) podem ser aplicados para reduzir ou eliminar estas funções. Tais alterações são conhecidas na arte. Por exemplo, é possível alterar a afinidade de uma região Fc de um anticorpo (e.g., uma IgG, tal como uma IgG de humano) por um FcR (e.g., Fc gama Rl), ou por uma ligação de Clq por substituição do(s) resíduo(s) específico(s) possuindo uma funcionalidade apropriada em sua cadeia lateral, ou por introdução de um grupo funcional carregado, tal como glutamato ou aspartato, ou um resíduo não-polar aromático tal como fenil-alanina, tirosina, triptofano ou alanina (veja, e.g., U.S. 5.624.821). Anticorpos anti-IL-17F ou anti-IL-17R da invenção podem ser úteis para isolamento, purificação, e/ou detecção de polipeptídeos IL-17F ou IL-17R, respectivamente, em sobrenadante, lisado celular, ou sobre a superfície celular. Adicionalmente, um técnico experiente reconhecerá métodos pelos quais anticorpos para IL-17F ou IL-17R podem ser usados nos métodos de seleção descritos abaixo. Anticorpos descritos nesta invenção também podem ser usados diagnosticamente para monitorar, e.g., níveis de proteína IL-17F, como parte de um procedimento de teste

clínico, ou clinicamente para selecionar um modulador terapêutico para uma célula ou um tecido compreendendo o antígeno do anticorpo. Por exemplo, um agente terapêutico tal como uma molécula pequena, ou outro agente terapêutico da invenção pode ser ligado em um anticorpo anti-IL-17F ou anti-IL-17R com o propósito de selecionar o agente terapêutico para a célula ou o tecido expressando IL-17F ou IL-17R, respectivamente. Alternativamente, um anticorpo para IL-17F ou IL-17R pode ser usado como um anticorpo inibitório, i.e., um antagonista, para diminuir, limitar, bloquear, ou diferentemente reduzir a ligação de IL-17F em IL-17R.

Em adição aos anticorpos para uso na presente invenção, outras moléculas também podem ser empregadas para modular a atividade de homodímeros de IL-17F, homodímeros de IL-17A, e/ou homodímeros de IL-17F/IL-17A. Tais moléculas incluem drogas imunofarmacêuticas modulares pequenas (SMIPTM) (Trubion Pharmaceuticals, Seattle, WA). SMIPs são polipeptídeos de cadeia única compostos de um domínio de ligação para uma estrutura cognata tal como um antígeno, um contra-receptor ou semelhante, um polipeptídeo de região-de-dobradiça possuindo quer um quer dois resíduos de cisteína, e domínios CH2 e CH3 de imunoglobulina (veja também www.trubion.com). SMIPs e seus usos e aplicações são descritos em, e.g., Pedidos de Patente U.S. Publicados de Nos. 2003/0118592, 2003/0133939, 2004/0058445, 2005/0136049, 2005/0175614, 2005/0180970, 2005/0186216, 2005/0202012, 2005/0202023, 2005/0202028, 2005/0202534, e 2005/0238646, e seus membros de família de patentes relacionados, todos os quais são aqui incorporados em suas totalidades.

Ensaios de Seleção

Os polinucleotídeos e polipeptídeos relacionados da invenção, incluindo anticorpos para os mesmos, podem ser usados em ensaios de seleção para identificar agentes farmacológicos ou prover compostos para agentes, incluindo anticorpos, que são capazes de modularem a atividade de

IL-17F em uma célula ou um organismo e são deste modo reguladores potenciais de respostas inflamatórias. Por exemplo, amostras contendo IL-17F (quer natural quer recombinante) podem ser contatadas com um de uma pluralidade de compostos de teste (quer agentes biológicos quer moléculas orgânicas pequenas), e a atividade biológica de IL-17F em cada uma das amostras tratadas pode ser comparada com a atividade biológica de IL-17F em amostras não tratadas ou em amostras contatadas com diferentes compostos de teste. Tais comparações determinarão se qualquer um dos compostos de teste resulta em: 1) um nível substancialmente diminuído de expressão ou atividade biológica de IL-17F, indicando deste modo um antagonista de IL-17F, ou 2) um nível substancialmente aumentado de expressão ou atividade biológica de IL-17F, indicando deste modo um agonista de IL-17F. Em uma modalidade, a identificação de compostos de teste capazes de modularem a atividade de IL-17F é realizada usando ensaios de seleção de produtividade alta, tais como ensaios BIACORE® (Biacore International AB, Uppsala, Suécia), BRET (transferência de energia de ressonância de bioluminescência), e FRET (transferência de energia de ressonância de fluorescência), bem como ELISA e ensaios baseados em célula.

Moléculas Pequenas

Atividade de IL-17F diminuída em um organismo (ou indivíduo) afligido com (ou sob risco de) distúrbios relacionados com IL-17F, e.g., inflamação das vias aéreas, e.g., em pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos, etc., ou em uma célula de um tal organismo (ou indivíduo) envolvido em tais distúrbios, também pode ser realizada por meio do uso de moléculas pequenas (normalmente moléculas orgânicas pequenas) que antagonizam, i.e., inibem a atividade de, IL-17F. Novas moléculas pequenas antagonísticas podem ser identificadas por métodos de seleção descritos

acima e podem ser usadas nos métodos de tratamento da presente invenção descritos abaixo.

O termo moléculas pequenas refere-se aos compostos que não são macromoléculas (veja, e.g., Karp (2000) *Bioinformatics Ontology* 16:269-85; Verkman (2004) *AJP-Cell Physiol.* 286:465-74). Assim, moléculas pequenas são muitas vezes consideradas aqueles compostos que são, e.g., menores do que um mil daltons (e.g., Voet e Voet, *Biochemistry*, 2nd ed., ed. N. Rose, Wiley & Sons, New York, 14 (1995)). Por exemplo, Davis et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:5981-86, usam a frase molécula pequena para indicar folatos, metotrexato e neuropeptídeos, enquanto que Halpin e Harbury (2004) *PLos Biology* 2:1022-30, usam a frase para indicar produtos de gene de molécula pequena, mas não limitados a, colesteróis, neurotransmissores, aptâmeros e siRNAs; moléculas pequenas sintetizadas incluem, mas não são limitadas a, vários compostos químicos listados em numerosos bancos de dados de moléculas pequenas comercialmente disponíveis, e.g., FCD (Banco de Dados de Compostos de Química Fina), SMID (Banco de Dados de Interação de Moléculas Pequenas), ChEBI (Entidades Químicas de Interesse Biológico), e CSD (Banco de Dados Estruturais de Cambridge) (veja, e.g., Alfarano et al. (2005) *Nuc. Acids Res. Database Issue* 33:D416-24).

Métodos para Diagnóstico, Prognóstico, e Monitoração do Progresso de Distúrbios Relacionados com IL-17F

A presente invenção proporciona métodos para diagnosticar, prognosticas, e monitorar o progresso de distúrbios relacionados com IL-17F em um indivíduo (e.g., distúrbios que direta ou indiretamente envolvem aumentos na bioatividade de IL-17F) por detecção de uma supra-regulação de atividade de IL-17F, incluindo mas não limitado ao uso de tais métodos em indivíduos humanos. Estes métodos podem ser realizados, e.g., por utilização de kits de diagnóstico pré-embalados compreendendo pelo menos um do

grupo compreendendo um polinucleotídeo de IL-17F ou IL-17R (ou seus fragmentos); um polipeptídeo IL-17F ou IL-17R (ou seus fragmentos e/ou suas proteínas de fusão); um anticorpo para um polipeptídeo IL-17F ou IL-17R (ou seus derivados); ou moduladores de polipeptídeos ou polinucleotídeos de IL-17F ou IL-17R como aqui descritos, que podem ser convenientemente usados, por exemplo, em ambiente clínico. Em adição, uma pessoa experiente na arte reconheceria que a supra-regulação de, e.g., IL-17F, também poderia ser detectada por métodos indiretos, tal como contagem do número de células imunes, e.g., neutrófilos.

"Diagnóstico" ou "diagnosticar" significa identificar a presença ou a ausência de uma condição patológica. Métodos de diagnóstico incluem detecção de supra-regulação de bioatividade de IL-17F por determinação de uma quantidade de teste dos produtos de gene (e.g., RNA, cDNA, ou polipeptídeo, incluindo seus fragmentos) de IL-17F em uma amostra biológica de um indivíduo (mamífero humano ou não-humano), e comparação da quantidade de teste com uma faixa ou quantidade normal (i.e., uma faixa ou quantidade de um indivíduo(s) conhecidamente sofrendo de distúrbios relacionados com IL-17F). Embora um método de diagnóstico particular possa não proporcionar um diagnóstico definitivo de distúrbios relacionados com IL-17F, é suficiente se o método proporciona uma indicação positiva que auxiliam diagnóstico.

A presente invenção também proporciona métodos para prognosticar tais distúrbios por detecção, por exemplo, de supra-regulação de atividade de IL-17F, e.g., por detecção de supra-regulação de IL-17F. "Prognóstico" ou "prognosticar" significa predizer o provável desenvolvimento e/ou a provável severidade de uma condição patológica. Métodos de prognóstico incluem a determinação da quantidade de teste de um produto de gene de IL-17F em uma amostra biológica de um indivíduo, e comparação da quantidade de teste com uma faixa ou quantidade de

prognóstico (i.e., uma faixa ou quantidade de indivíduos com severidades variadas de distúrbios relacionados com IL-17F) para o produto de gene de IL-17F. Várias quantidades de produto de gene de IL-17F em uma amostra de teste são consistentes com certos prognósticos para distúrbios relacionados com IL-17F. A detecção de uma quantidade de produto de gene de IL-17F em um nível de prognóstico particular proporciona um prognóstico para o indivíduo.

A presente invenção também proporciona métodos para monitoração do progresso ou do curso de tais distúrbios relacionados com IL-17F por detecção, por exemplo, da supra-regulação da atividade de IL-17F, e.g., por detecção da supra-regulação de IL-17F. Métodos de monitoração incluem determinação de quantidades de teste de um produto de gene de IL-17F em amostras biológicas tiradas de um indivíduo em um primeiro e segundo tempo, e comparação das quantidades. Uma mudança na quantidade de um produto de gene de IL-17F entre os primeiro e segundo tempos indica uma mudança no curso de um distúrbio relacionado com IL-17F, com uma diminuição na quantidade indicando remissão de tais distúrbios, e um aumento na quantidade indicando progressão de tais distúrbios. Tais ensaios de monitoração também são úteis para avaliar a eficácia de uma intervenção terapêutica particular em pacientes sendo tratados para distúrbios autoimunes.

IL-17F aumentada em métodos esboçados acima pode ser detectada em uma variedade de amostras biológicas, incluindo fluidos corporais (e.g., sangue inteiro, plasma, e urina), células (e.g., células inteiras, frações de célula, e extrator de célula), e outros tecidos. Amostras biológicas também incluem seções de tecido, tais como biópsias e seções congeladas obtidas para propósitos histológicos. Amostras biológicas preferidas incluem sangue, plasma, linfa, biópsias de tecido, urina, CSF (fluido cerebroespinhal), fluido sinovial, e BAL (lavagem bronquioalveolar). Será reconhecido que análise de uma amostra biológica não precisa necessariamente requerer a

remoção de células ou de tecido do indivíduo. Por exemplo, agentes apropriadamente marcados que se liguem em produtos de gene de IL-17F (e.g., antibióticos, ácidos nucleicos) podem ser administrados a um indivíduo e visualizados (quando ligados no alvo) usando tecnologia de imagem padrão (e.g. CAT, NMR (MRI), e PET).

Nos ensaios de diagnóstico e de prognóstico da presente invenção, o produto de gene de IL-17F é detectado e quantificado para dar uma quantidade de teste. A quantidade de teste é então comparada com uma faixa ou quantidade normal. Uma quantidade significativamente acima da faixa ou quantidade normal é um sinal positivo no diagnóstico de distúrbios relacionados com IL-17F. Métodos particulares de detecção e quantificação de produtos de gene de IL-17F são descritos abaixo.

Quantidades normais ou níveis de linha base de produtos de gene de IL-17F podem ser determinadas(os) para qualquer população ou tipo de amostra particular. Geralmente, níveis de linha base (normais) de proteína IL-17F ou de mRNA são determinados por medição de quantidades respectivas de proteína IL-17F ou mRNA em um tipo de amostra biológica de indivíduos normais (i.e., saudáveis). Alternativamente, valores normais de produtos de gene de IL-17F podem ser determinados por medição da quantidade em tecidos ou células saudáveis obtidos do mesmo indivíduo do qual os tecidos ou as células de teste doentes (ou possivelmente doentes) foram retirados. A quantidade de produtos de gene de IL-17F (quer a quantidade normal quer a quantidade de teste) pode ser determinada ou expressada em uma base por célula, por proteína total, ou por volume. Para determinar a quantidade de célula de uma amostra, pode-se medir o nível de produto de gene constitutivamente expressado ou de outro produto de gene expressado em níveis conhecidos em células do tipo do qual a amostra biológica foi obtida.

Será reconhecido que os métodos de ensaio da presente

invenção não necessariamente requerem medição de valores absolutos de produtos de gene de IL-17F porque valores relativos são suficientes para muitas aplicações destes métodos. Também será reconhecido que em adição à quantidade ou abundância de produtos de gene de IL-17F, produtos de gene IL-17F anormais ou variantes ou seus padrões de expressão (e.g., transcritos mutados, polipeptídeos truncados) podem ser identificados por comparação com padrões de expressão e produtos de gene normais.

Se a expressão de um gene ou uma proteína particular em duas amostras é significativamente similar ou significativamente diferente, e.g., significativamente acima ou significativamente abaixo de um dado nível, depende do próprio gene e, *inter alia*, de sua variabilidade em expressão entre indivíduos diferentes ou amostras diferentes. Está dentro da capacidade da arte a determinação de se os níveis de expressão são significativamente similares ou diferentes. Fatores tais como variação genética, e.g., em níveis de expressão de IL-17F e/ou IL-17R, entre indivíduos, espécies, órgãos, tecidos, ou células podem ser levados em consideração (quando e onde necessário) para determinar se o nível de expressão, e.g., de IL-17F e/ou IL-17R, entre duas amostras é significativamente similar ou significativamente diferente, e.g., significativamente acima de um dado nível. Como um resultado da heterogeneidade natural em expressão de gene entre indivíduos, espécies, órgãos, tecidos, ou células, frases tais como "significativamente similar" ou "significativamente acima" não podem ser definidas como um valor preciso ou uma percentagem precisa, mas em vez disso podem ser determinados por uma pessoa experiente na arte ao praticar a invenção.

Os ensaios de diagnóstico, prognóstico, e monitoração da presente invenção envolvem detecção e quantificação de produtos de gene de IL-17F em amostras biológicas. Produtos de gene de IL-17F incluem mRNAs e polipeptídeos, e ambos podem ser medidos usando métodos bem conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte.

Por exemplo, mRNA pode ser diretamente detectado e quantificado usando ensaios baseados em hibridização, tais como hibridização de Northern, hibridização *in situ*, *blots* de ponto e fenda, e ensaios de oligonucleotídeo. Ensaios baseados em hibridização referem-se aos ensaios nos quais um ácido nucleico sonda é hibridizado em um ácido nucleico alvo. Em alguns formatos, o alvo, a sonda, ou ambos estão imobilizados. O ácido nucleico imobilizado pode ser DNA, RNA, ou outro oligonucleotídeo ou polinucleotídeo, e pode compreender nucleotídeos naturalmente ou não-naturalmente ocorrentes, análogos de nucleotídeo, ou estruturas principais. Métodos de seleção de seqüências de sonda de ácido nucleico para uso na presente invenção (baseado na seqüência de ácido nucleico de IL-17F) são bem conhecidos na arte.

Alternativamente, mRNA pode ser amplificado antes da detecção e quantificação. Tais ensaios baseados em amplificação são bem conhecidos na arte e incluem reação em cadeia de polimerase (PCR), PCR com transcrição reversa (RT-PCR), PCR - ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (PCR-ELISA), e reação em cadeia de ligase (LCR). Iniciadores e sondas para produção e detecção de produtos de gene de IL-17F amplificados (e.g., mRNA ou cDNA) podem ser prontamente planejados e produzidos sem experimentação indevida por aquelas pessoas experientes na arte baseado nas seqüências de ácido nucleico de IL-17F. Produtos de gene de IL-17F amplificados podem ser diretamente analisados, por exemplo, por eletroforese em gel; por hibridização de um ácido nucleico sonda; por seqüenciamento; ou por qualquer detecção de um sinal fluorescente, fosforescente, ou radioativo; ou por qualquer um de uma variedade de métodos bem conhecidos. Em adição, métodos são conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte para aumentar o sinal produzido por amplificação de seqüências de ácido nucleico alvo. Uma pessoa experiente na arte reconhecerá que, qualquer que seja o método de amplificação usado, uma variedade de métodos quantitativos

conhecidos na arte (e.g., PCR quantitativa) pode ser usada se a quantificação dos produtos de gene for desejada.

Um polipeptídeo IL-17F (ou seu fragmento) pode ser detectado usando vários ensaios imunológicos bem conhecidos empregando os respectivos anticorpos anti-IL-17F que podem ser gerados como descritos acima. Ensaios imunológicos referem-se aos ensaios que utilizam um anticorpo (e.g., policlonal, monoclonal, quimérico, humanizado, scFv, e/ou seus fragmentos) que especificamente se liga em, e.g., um polipeptídeo IL-17F (ou um seu fragmento). Tais ensaios imunológicos bem conhecidos adequados para a prática da presente invenção incluem ELISA, radioimunoensaio (RIA), imunoprecipitação, imunofluorescência, fracionamento celular ativado por fluorescência (FACS), e *Western blotting*. O técnico ordinariamente experiente também reconhecerá que um polipeptídeo IL-17F também pode ser detectado usando um polipeptídeo(s) IL-17F marcado(s).

Uma pessoa experiente na arte entenderá que os métodos acima mencionados podem ser aplicados aos distúrbios relacionados com IL-17F, incluindo, mas não limitados a, inflamação das vias aéreas, e.g., em pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos, etc.

Uso de Antagonistas de IL-17F em Terapia

Os inventores acreditam que são os primeiros a reconhecerem que a ligação de IL-17R por IL-17F está correlacionada com inflamação das vias aéreas, e.g., em pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos. Como tal, a presente invenção descreve métodos para usar antagonistas de IL-17F para tratar inflamação das vias aéreas, e.g., m pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos.

Os antagonistas de IL-17F aqui descritos, incluindo

moduladores de atividade de polipeptídeo e/ou polinucleotídeo de IL-17F e/ou IL-17R identificados usando os métodos descritos acima, podem ser usados *in vitro*, *ex vivo*, o incorporados em composições farmacêuticas e administrados a indivíduos *in vivo* para tratar, por exemplo, inflamação das vias aéreas, e.g., m pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos, por administração de um antagonista de IL-17F (e.g., polinucleotídeos inibitórios de IL-17F e/ou IL-17R; polipeptídeos IL-17R solúveis (incluindo seus fragmentos e/ou suas proteínas de fusão); anticorpos anti-IL-17F ou anti-IL-17R inibitórios; e/ou moléculas pequenas antagonísticas, etc.). Várias abordagens farmacogenômicas a serem consideradas na determinação de se administram antagonistas de IL-17F são bem conhecidas por uma pessoa experiente na arte e incluem associação ampla de genoma, abordagem de gene candidato, e perfil de expressão de gene. Uma composição farmacêutica da invenção é formulada para ser compatível com sua rota de administração intencionada (e.g., composições orais geralmente incluem um diluente inerte ou um carreador edível). Outros exemplos não limitantes de rotas de administração incluem administração parenteral (e.g., intravenosa), intradermal, subcutânea, oral (e.g., inalação), transdermal (tópica), transmucosal, e retal. As composições farmacêuticas compatíveis com cada rota intencionada são bem conhecidas na arte.

Antagonistas de IL-17F podem ser usados como composições farmacêuticas quando combinados com um carreador farmaceuticamente aceitável. Uma tal composição pode conter, em adição aos antagonistas de IL-17F e um veículo, vários diluentes, cargas, sais, tampões, estabilizadores, agentes de solubilização, e outros materiais bem conhecidos na arte. O termo "farmaceuticamente aceitável" significa uma quantidade não-tóxica de material que não interfere com a efetividade da atividade biológica do(s) ingrediente(s) ativo(s). As características do carreador dependerão da rota de

administração.

A composição farmacêutica da invenção também pode conter citocinas, linfocina, ou outros fatores hematopoiéticos tais como M-CSF, GMCSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, G-CSF, fator de célula-tronco, e eritropoietina. A composição farmacêutica também pode incluir anticorpos anticitocina como descrito com mais detalha abaixo. A composição farmacêutica pode conter fatores trombolíticos ou antitrombóticos tais como ativador de plasminogênio e Fator VIII. A composição farmacêutica pode conter adicionalmente outros agentes antiinflamatórios como descrito com mais detalhe abaixo. Tais fatores e/ou agentes adicionais podem ser incluídos na composição farmacêutica para produzir um efeito sinérgico com antagonistas de IL-17F, ou para minimizar efeitos colaterais causados pelo antagonista de IL-17F. Inversamente os antagonistas de IL-17F podem ser incluídos em formulações de particular citocina, linfocina, outro fator hematopoiético, fator trombolítico ou antitrombótico, ou agente antiinflamatório para minimizar os efeitos colaterais de citocina, linfocina, outro fator hematopoiético, fator trombolítico ou antitrombótico, ou agente antiinflamatório.

A composição farmacêutica da invenção pode estar na forma de um lipossoma no qual antagonistas de IL-17F são combinados, em adição a outros carreadores farmaceuticamente aceitáveis, com agentes anfipáticos tais como lipídeos que existem na forma agregada como micelas, monocamadas insolúveis, cristais líquidos, ou camadas lamelares em solução aquosa. Lipídeos adequados para formulação lipossômica incluem, sem limitação, monoglicerídeos, diglicerídeos, sulfatídeos, lisolecitina, fosfolipídeos, saponina, ácidos biliares, etc. Preparação de tais formulações lipossômicas está dentro do nível de capacidade da arte, como descrito, por exemplo, em Patente U.S. de No 4.235.871; Patente U.S. de No 4.501.728; Patente U.S. de No 4.837.028; e Patente U.S. de No 4.737.323, todas as quais

são por meio deste aqui incorporadas como referências.

Como aqui usado, o termo "quantidade terapeuticamente efetiva" significa a quantidade total de cada componente ativo da composição farmacêutica ou do método que é suficiente para mostrar um benefício significativo para o paciente, e.g., melhoria dos sintomas de, cura de, ou aumento da velocidade de cura de tais condições. Quando aplicado ao ingrediente ativo individual, administrado sozinho, o termo refere-se apenas àquele ingrediente. Quando aplicado a uma combinação, o termo refere-se às quantidades combinadas dos ingredientes ativos que resultam no efeito terapêutico, sejam administradas em combinação, serialmente ou simultaneamente. Na prática do método de tratamento ou no uso da presente invenção, uma quantidade terapeuticamente efetiva de um antagonista de IL-17F é administrada a um indivíduo, e.g., um mamífero (preferivelmente um humano). Um antagonista de IL-17F pode ser administrado de acordo com o método da invenção quer sozinho quer em combinação com outras terapias, tais como tratamentos empregando citocinas, linfocinas ou outros fatores hematopoiéticos, ou agentes antiinflamatórios. Quando co-administrados com um ou mais agentes, os antagonistas de IL-17F podem ser administrados quer simultaneamente com o segundo agente, quer seqüencialmente. Se administrados seqüencialmente, o médico atendente decidirá sobre a seqüência apropriada de administração, e.g., um polipeptídeo IL-17R (ou sua proteína de fusão) e/ou anticorpo inibitório, em combinação com outros agentes.

Quando uma quantidade terapeuticamente efetiva de um antagonista de IL-17F for administrada oralmente, o agente ligante estará na forma de um tablete, uma cápsula, um pó, uma solução ou um elixir. Quando administrada na forma de um tablete, a composição farmacêutica da invenção pode conter adicionalmente um carreador sólido tal como uma gelatina ou um adjuvante. O tablete, a cápsula, e o pó contêm de cerca de 5% a 95% de

agente ligante, e preferivelmente de cerca de 25% a 90% de agente ligante. Quando administrada na forma líquida, pode ser adicionado um carreador líquido tal como água, petróleo, óleos de origem animal ou vegetal tal como óleo de amendoim (se bem que tendo em mente a freqüência de alergias ao amendoim na população), óleo mineral, óleo de feijão-soja, ou óleo de gergelim, ou óleos sintéticos. A forma líquida da composição farmacêutica pode conter adicionalmente solução salina fisiológica, solução de dextrose ou de outro sacarídeo, ou glicóis tais como etileno-glicol, propileno-glicol, ou poli(etileno-glicol). Quando administrada na forma líquida, a composição farmacêutica consiste de cerca de 0,5% a 90% em peso de agente ligante, e preferivelmente de cerca de 1% a cerca de 50% em peso de agente ligante.

Quando uma quantidade terapeuticamente efetiva de um antagonista de IL-17F for administrada por injeção intravenosa, cutânea ou subcutânea, o antagonista de IL-17F estará na forma de uma solução aquosa parenteralmente aceitável, livre de pirogênio. A preparação de tais soluções de proteína parenteralmente aceitáveis, possuindo devido ao pH, isotonicidade, estabilidade, e semelhante, está dentro da capacidade daqueles na arte. Uma composição farmacêutica preferida para injeção intravenosa, cutânea, ou subcutânea deve conter, em adição ao antagonista de IL-17F, um carreador isotônico tal como injeção de cloreto de sódio, injeção de Ringer, injeção de dextrose, injeção de dextrose e cloreto de sódio, injeção de Ringer lactada, ou outros carreadores como conhecidos na arte. A composição farmacêutica da presente invenção também pode conter estabilizadores, conservantes, tampões, antioxidantes, ou outros aditivos conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte.

A quantidade de um antagonista de IL-17F na composição farmacêutica da presente invenção dependerá da natureza e da severidade da condição sendo tratada, e da natureza dos tratamentos anteriores que o paciente tem sofrido. Em fim, o médico atendente decidirá a quantidade de

um antagonista de IL-17F para tratar cada paciente individual. Inicialmente, o médico atendente administrará doses baixas de um antagonista de IL-17F e observará a resposta do paciente. Doses maiores de um antagonista de IL-17F podem ser administradas até que o efeito terapêutico ótimo seja obtido para o paciente, e naquele ponto a dosagem não é geralmente adicionalmente aumentada. É contemplado que as várias composições farmacêuticas usadas para praticar o método da presente invenção devem conter cerca de 0,1 μg a cerca de 100 mg de antagonista de IL-17F, e.g., IL-17R recombinante (incluindo suas proteínas de fusão), por kg de peso corporal.

A duração da terapia intravenosa (i.v.) usando uma composição farmacêutica da presente invenção variará, dependendo da severidade da doença sendo tratada e da condição e da resposta idiossincrática potencial de cada paciente individual. É contemplado que a duração de cada aplicação de um antagonista de IL-17F pode estar dentro da faixa de 12 a 24 horas de administração i.v. contínua. Também é contemplada terapia subcutânea (s.c.) usando uma composição farmacêutica da presente invenção. Estas terapias podem ser administradas diariamente, semanalmente, ou, mais preferivelmente, bi-semanalmente, ou mensalmente. Também é contemplado que se o antagonista de IL-17F for uma molécula pequena (e.g., para liberação oral), as terapias poderão ser administradas diariamente, duas vezes ao dia, três vezes ao dia, etc. Em fim o médico atendente decidirá sobre a duração apropriada da terapia i.v. ou s.c., ou da terapia com uma molécula pequena, e o tempo de administração da terapia usando a composição farmacêutica da presente invenção.

É esperado que os polinucleotídeos e as proteínas da presente invenção exibam um ou mais dos usos ou atividades biológicas (incluindo aquelas associadas com os ensaios aqui citados) identificados abaixo. Usos ou atividades descritos para proteínas da presente invenção podem ser proporcionados por administração ou uso de tais proteínas ou por

administração ou uso de polinucleotídeos codificadores de tais proteínas (tais como, por exemplo, em terapias genéticas ou vetores adequados para introdução de DNA).

Uso de Antagonistas de IL-17F para Diminuir a Inflamação das vias aéreas

Em um aspecto, a invenção caracteriza-se por um método de diminuição de inflamação das vias aéreas, e.g., m pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos. O método pode compreender contatar uma população de células com um antagonista de IL-17F (e.g., polinucleotídeos inibitórios de IL-17F e/ou IL-17R; polipeptídeos IL-17R solúveis (incluindo seus fragmentos e/ou suas proteínas de fusão); anticorpos anti-IL-17F ou anti-IL-17R inibitórios; e/ou moléculas pequenas antagonísticas, etc.) em uma quantidade suficiente para inibir a atividade de IL-17F da célula ou população.

Estes métodos são baseados, pelo menos em parte, na descoberta de que IL-17F se liga em IL-17R (Exemplo 4) e que a concentração de IL-17F em saliva de pacientes com fibrose cística está diretamente correlacionada com o grau de exacerbação pulmonar (Exemplo 7). Conseqüentemente, antagonistas de IL-17F, i.e., moléculas que inibem a atividade de IL-17F (e.g., anticorpos anti-IL-17F), podem ser usados para diminuir a inflamação das vias aéreas, e.g., m pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos.

Os métodos de uso de antagonistas de IL-17F também podem ser usados para inibir a atividade inflamatória de IL-17F e assim, podem ser usados para tratar ou prevenir uma variedade de distúrbios imunes. Exemplos não limitantes dos distúrbios que podem ser tratados ou prevenidos incluem, mas não são limitados a, rejeição de transplante, doenças autoimunes (incluindo, por exemplo, diabete melito, artrite (incluindo artrite reumatóide,

artrite reumatóide juvenil, osteoartrite, artrite psoriática), esclerose múltipla, encefalomielite, miastenia grave, lúpus eritematoso sistêmico, tiroidite autoimune, dermatite (incluindo dermatite atópica e dermatite eczematosa), psoríase, síndrome de Sjögren, doença de Crohn, úlcera aftosa, irite, conjuntivite, ceratoconjuntivite, colite ulcerativa, espondiloartropatia, espondilite anquilosante, asma intrínseca, asma alérgica, lúpus eritematoso cutâneo, escleroderma, vaginite, protite, erupções de droga, reações reversas de lepra, eritema nodoso leproso, uveíte autoimune, encefalomielite alérgica, encefalopatia hemorrágica necrosante aguda, perda auditiva sensorineural progressiva bilateral idiopática, anemia aplástica, anemia de célula vermelha pura, trombocitopenia idiopática, policondrite, granulomatose de Wegener, hepatite ativa crônica, síndrome de Stevens-Johnson, psilose idiopática, líquen plano, doença de Graves, sarcoidose, cirrose biliar primária, uveíte posterior, e fibrose pulmonar intersticial), doença de enxerto-versus-hospedeiro, e alergia tal como, alergia atópica. Distúrbios preferidos que podem ser tratados usando os métodos, que compreendem a administração de antagonistas de IL-17F, e.g., um anticorpo anti-IL-17F inibitório, incluem inflamação das vias aéreas, e.g., m pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos.

Usando os antagonistas de IL-17F (e.g., polinucleotídeos inibitórios de IL-17F e/ou IL-17R; polipeptídeos IL-17R solúveis (incluindo seus fragmentos e/ou suas proteínas de fusão); anticorpos anti-IL-17F ou anti-IL-17R inibitórios; e/ou moléculas pequenas antagonísticas, etc.), é possível modular as respostas imunes em numerosas maneiras. Infra-regulação pode ser na forma de inibição ou bloqueio de uma resposta inflamatória já em progresso, ou pode envolver prevenção da indução de uma resposta inflamatória.

Em uma modalidade, antagonistas de IL-17F, incluindo suas composições farmacêuticas, são administrados em terapia de combinação, i.e.,

combinados com outros agentes, e.g., agentes terapêuticos, que são úteis para o tratamento de condições ou distúrbios patológicos, tais como distúrbios imunes e doenças inflamatórias (incluindo inflamação das vias aéreas). O termo "em combinação" neste contexto significa que os agentes são dados substancialmente contemporaneamente, quer simultaneamente quer seqüencialmente. Se dados seqüencialmente, no início da administração do segundo composto, o primeiro dos dois compostos é preferivelmente ainda detectável em concentrações efetivas no sítio de tratamento.

Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir um ou mais antagonistas de IL-17F (e.g., polinucleotídeos inibitórios de IL-17F e/ou IL-17R; polipeptídeos IL-17R solúveis (incluindo seus fragmentos e/ou suas proteínas de fusão); anticorpos anti-IL-17F ou anti-IL-17R inibitórios; e/ou moléculas pequenas antagonísticas, etc.) co-formulados com, e/ou co-administrados com, um ou mais agentes terapêuticos adicionais, e.g., um ou mais inibidores de fator de crescimento e citocina, imunossupressores, agentes antiinflamatórios, inibidores metabólicos, inibidores de enzima, e/ou agentes citotóxicos ou citostáticos, como descrito com mais detalhe abaixo. Em adição, um ou mais antagonistas de IL-17F aqui descritos podem ser usados em combinação com dois ou mais dos agentes terapêuticos aqui descritos. Tais terapias de combinação podem vantajosamente utilizar dosagens menores dos agentes terapêuticos administrados, evitando assim possíveis complicações ou toxicidades associadas com as várias monoterapias. Além disso, os agentes terapêuticos aqui descritos atuam sobre rotas que diferem da rota de sinalização de IL-17F, e assim é esperado que apresentem intensificação e/ou sinergia com os efeitos dos antagonistas de IL-17F.

Agentes terapêuticos preferidos usados em combinação com um antagonista de IL-17F são aqueles agentes que interferem em estágios diferentes em uma resposta inflamatória (incluindo inflamação das vias

aéreas). Em uma modalidade, um ou mais antagonistas de IL-17F aqui descritos podem ser co-formulados com, e/ou co-administrados com, um ou mais agentes adicionais tais como outros antagonistas de fator de crescimento ou citocina (e.g., receptores solúveis, inibidores de peptídeo, moléculas pequenas, fusões de ligante); ou anticorpos ou seus fragmentos ligantes em antígeno que se ligam em outros alvos (e.g., anticorpos que se ligam em outros fatores de crescimento ou citocinas, seus receptores, ou outras moléculas de superfície celular); e citocinas antiinflamatórias ou seus agonistas. Assim, um ou mais antagonistas de IL-17F aqui descritos podem ser usados em combinação com um ou mais inibidores de citocina, inibidores de fator de crescimento, imunossupressores, agentes antiinflamatórios, inibidores metabólicos, inibidores de enzima, agentes citotóxicos, e agentes citostáticos. Exemplos não limitantes de agentes que podem ser usados em combinação com antagonistas de IL-17F aqui descritos, incluem, mas não são limitados a, antagonistas de uma ou mais interleucinas (ILs) ou seus receptores, e.g., antagonistas de IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, e IL-22; antagonistas de citocinas ou fatores de crescimento ou seus receptores, tais como fator de necrose de tumor (TNF), LT, EMAP-II, GM-CSF, FGF e PDGF. Antagonistas de IL-17F também podem ser combinados com inibidores de, e.g., anticorpos para, moléculas de superfície celular tais como CD2, CD3, CD4, CD8, CD20 (e.g., o inibidor de CD20 rituximabe (RITUXAN®)), CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, ou seus ligantes, incluindo CD154 (gp39 ou CD40L), ou LFA-1/ICAM-1 e VLA-4/VCAM-1 (Yusuf-Makagiansar et al. (2002) *Med. Res. Rev.* 22:146-67). Antagonistas preferidos que podem ser usados em combinação com antagonistas de IL-17F aqui descritos incluem antagonistas de IL-1, IL-12, TNF-α, IL-15, IL-18, e IL-22.

Exemplos daqueles agentes incluem antagonistas de IL-12, tais como anticorpos quiméricos, humanizados, de humano ou gerados *in vitro* (ou

seus fragmentos ligantes em antígeno) que se ligam em IL-12 (preferivelmente IL-12 de humano), e.g., o anticorpo descrito em WO 00/56772; inibidores de receptor de IL-12, e.g., anticorpos para receptor de IL-12 de humano, e fragmentos solúveis do receptor de IL-12, e.g., receptor de IL-12 de humano. Exemplos de antagonistas de IL-15 incluem anticorpos (ou seus fragmentos ligantes de antígeno) contra IL-15 ou seu receptor, e.g., anticorpos quiméricos, humanizados ou gerados *in vitro* para IL-15 de humano ou seu receptor, fragmentos solúveis do receptor de IL-15, e proteínas ligantes em IL-15. Exemplos de antagonistas de IL-18 incluem anticorpos, e.g., anticorpos quiméricos, humanizados, de humano ou gerados *in vitro* (ou seus fragmentos ligantes de antígeno), para IL-18 de humano, fragmentos solúveis de receptor de IL-18, e proteínas ligantes em IL-18 (IL-18BP, Mallat et al. (2001) *Circ. Res.* 89:e41-45). Exemplos de antagonistas de IL-1 incluem inibidores de enzima conversora de interleucina-1(ICE), tais como Vx740, antagonistas de IL-1, e.g., IL-1RA (anaquinra - KINERET™, Amgen), sIL1RII (Immunex), e anticorpos anti-receptor de IL-1 (ou seus fragmentos ligantes de antígeno).

Exemplos de antagonistas de TNF incluem anticorpos quiméricos, humanizados, de humano ou gerados *in vitro* (ou seus fragmentos ligantes de antígeno) para TNF (e.g., TNFα de humano), tal como HUMIRA™ (D2E7, anticorpo para TNFα de humano, Patente U.S. de No. 6.258.562), CDP-571/CDP-870BAY-10-3356 (anticorpo anti-TNF-α humanizado; Celltech/Pharmacia), cA2 anticorpo anti-TNF-α quimérico; REMICADE®, Centocor); fragmentos de anticorpo anti-TNF (e.g., CPD870); fragmentos solúveis de receptores de TNF, e.g., receptores de RNF de humano p55 ou p75 ou seus derivados, e.g., TNFR-IgG de 75 kd (proteína de fusão de IgG - receptor de TNF de 75 kD, ENBREL™; Immunex), TNFR-IgG p55 kd (proteína de fusão de IgG – receptor de TNF de 55 kD (LENERCEPT®)); antagonistas de enzima, e.g., inibidores de enzima

conversora de TNFα (TACE) (e.g., um derivado de ácido alfa-sulfonil-hidroxâmico, WO 01/55112, e inibidor de N-hidróxi-formamida TACE GW 3333, -005, ou - 022); e TNF-bp/s-TNFR (proteína ligante em TNF solúvel). Antagonistas de TNF preferidos são fragmentos solúveis dos receptores de TNF, e.g., receptores de TNF de humano p55 ou p75 ou seus derivados, e.g., TNFR-IgG de 75 kd, e inibidores de enzima conversora de TNFα (TACE).

Em outras modalidades, os antagonistas de IL-17F aqui descritos podem ser administrados em combinação com um ou mais dos seguintes: antagonistas de IL-13, e.g., receptores de IL-13 solúveis (sIL-13) e/ou anticorpos contra antagonistas de IL-13; antagonistas de IL-2, e.g., DAB 486-IL-2 e/ou DAB 389-IL-2 (proteínas de fusão de IL-2), e/ou anticorpos para IL-2R, e.g., anti-Tac (anti-IL-2R humanizado; Protein Design Labs). Ainda outra combinação inclui anticorpos para IL-17F (e.g., polinucleotídeos inibitórios de IL-17F e/ou IL-17R; polipeptídeos IL-17R solúveis (incluindo seus fragmentos e/ou suas proteínas de fusão), anticorpos anti-IL-17F ou anti-IL-17R inibitórios; e/ou moléculas pequenas antagonísticas, etc.), em combinação com inibidores anti-CD4 não-depletantes (IDEC-CE9.1/SB 210396; anticorpo anti-CD4 iniciado não-depletante; IDEC/SmithKline). Ainda outras combinações incluem antagonistas de rota coestimulante CD80 (B7.1) ou CD86 (B7.2), incluindo anticorpos, receptores solúveis ou ligantes antagonísticos; bem como ligante de glicoproteína p-seletina (PSGL), citocinas antiinflamatórias, e.g., IL-4 (DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; IL-10 recombinante DNAX/Schering); IL-13 e TGF-β, e seus agonistas (e.g., anticorpos agonistas).

Em outras modalidades, um ou mais antagonistas de IL-17F podem ser co-formulados com, e/ou co-administrados com, uma ou mais drogas antiinflamatórias, imunossupressores, ou inibidores metabólicos ou enzimáticos. Exemplos não limitantes de drogas ou inibidores que podem ser usados em combinação com os antagonistas de IL-17F aqui descrito incluem,

mas não são limitados a, um ou mais de: droga(s) antiinflamatória(s) não-esteroidal(ais) (NSAIDs), e.g., ibuprofeno, tenidape, naproxeno, meloxicam, piroxicam, diclofenac, e indometacina; sulfasalazina; corticosteróides tal como prednisolona; droga(s) antiinflamatória(s) supressora(s) de citocina (CSAIDs); inibidores de biossíntese de nucleotídeo, e.g., inibidores de biossíntese de purina, antagonistas de folato (e.g., metotrexato (ácido N-[4-[[(2,4-diamino-6-pteridinil)-metil]-metil-amino]-benzoil]-L-glutâmico); e inibidores de biossíntese de pirimidina, e.g., inibidores de diidro-orotato desidrogenase (DHODH) (e.g., leflunomida). Agentes terapêuticos preferidos para uso em combinação com antagonistas de IL-17F incluem NSAIDs, CSAIDs, inibidores (DHODH) (e.g., leflunomida), e antagonistas de folato (e.g., metotrexato).

Exemplos de inibidores adicionais incluem um ou mais de: corticosteróides (orais, inalados e de injeção local); imunossupressores, e.g., ciclosporina, tacrolimus (FK-506); e inibidores de mTOR, e.g., sirolimus (rapamicina -RAPAMUNE^{TM}) ou derivados de rapamicina, e.g., derivados solúveis de rapamicina (e.g., derivados de éster de rapamicina, e.g., CCI-779 (Elit (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3(8):1249-53; Huang et al. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3(2):295-304); agentes que interferem com a sinalização por citocinas pró-inflamatórias tais como TNFα ou IL-1 (e.g. inibidores de IRAK, NIK, IKK, p38 ou MAP cinase); inibidores de Cox2, e.g., celecoxibe, rofecoxibe, e suas variantes; inibidores de fosfodiesterase, e.g., inibidores de fosfolipase R973401 (inibidor de fosfodiesterase de Tipo IV), e.g., inibidores de fosfolipase citosólica 2 (cPLA2) (e.g., análogos de trifluorometil-cetona (Patente U.S. de No. 6,350,892)); inibidores de fator de crescimento de célula endotelial vascular ou receptor de fator de crescimento, e.g., inibidor de VEGF e/ou inibidor de VEGF-R; e inibidores de angiogênese. Agentes terapêuticos preferidos para uso em combinação com antagonistas de IL-17F são imunossupressores, e.g., ciclosporina, tacrolimus

(FK-506); inibidores de mTOR, e.g., sirolimus (rapamicina) ou derivados de rapamicina, e.g., derivados solúveis de rapamicina (e.g., derivados de éster de rapamicina, e.g., CCI-779); inibidores de Cox2, e.g., celecoxibe e suas variantes; e inibidores de fosfolipase, e.g., inibidores de fosfatase citosólica 2 (cPLA2), e.g., análogos de trifluorometil-cetona.

Exemplos adicionais de agentes terapêuticos que podem ser combinados com antagonista de IL-17F incluem um ou mais de: 6-mercapto-purinas (6-MP); azatioprina; sulfasalazina; mesalazina; olsalazina; cloroquinina/ hidróxi-cloroquina (PLAQUENIL®); pencilamina; aurotiomalato (intramuscular e oral); azatioprina; colquicina; antagonistas de adrenorreceptor beta-2 (salbutamol, terbutalina, salmeterol); xantinas (teofilina, arninofilina); cromoglicato; nedocromil; cetotifeno; ipratrópio e oxitrópio; micofenolato mofetil; agonistas de adenosina; agentes antitrombóticos; inibidores de complemento; e agentes adrenérgicos.

O uso de antagonistas de IL-17F aqui descritos em combinação com outros agentes terapêuticos para tratar ou prevenir distúrbios específicos relacionados com IL-17F é discutido com detalha adicional abaixo.

Exemplos não limitantes de agentes para tratar ou prevenir distúrbios artríticos (e.g., artrite reumatóide, artrite inflamatória, artrite reumatóide juvenil, osteoartrite e artrite psoriática), com os quais os antagonistas de IL-17F podem ser combinados incluem um ou mais dos seguintes: antagonistas de IL-12 como aqui descritos; NSAIDs; CSAIDs; TNFs, e.g., antagonistas de TNFα como aqui descritos; anticorpos anti-CD4 não-depletantes como aqui descritos; antagonistas de IL-2 antagonistas como aqui descritos; citocinas antiinflamatórias, e.g., IL-4, IL-10, IL- 13 e TGFα, ou seus agonistas; antagonistas de IL-1 ou de receptor de IL-1 como aqui descritos; inibidores de fosfodiesterase como aqui descritos; inibidores de Cox-2 como aqui descritos; iloproste; metotrexato; talidomida e drogas

relacionadas com talidomida (e.g., Celgen); leflunomida; inibidor de ativação de plasminogênio, e.g., ácido tranexâmico; inibidor de citocina, e.g., T-614; prostaglandina El; azatioprina; um inibidor de enzima conversora de interleucina-1 (ICE); inibidor zap-70 e/ou lck (inibidor de tirosina cinase zap-70 ou lck); um inibidor de fator de crescimento de célula endotelial vascular ou de receptor de fator de crescimento de célula endotelial vascular como aqui descrito; um inibidor de angiogênese como aqui descrito; drogas antiinflamatórias corticosteróides (e.g., SB203580); inibidores de TNF-convertase; inibidores de IL-11; IL-13; IL-17; ouro; penicilamina; cloroquina; hidróxi-cloroquina; clorambucil; ciclofosfamida; ciclosporina; irradiação linfóide total; globulina antitimócito; toxinas-CD5; colágeno e peptídeos oralmente administrados; lobenzarite dissódico; agentes reguladores de citocina (CRAs) HP228 e HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); ICAM-1 anti-sentido fosforotioato oligodesoxinucleotídeos (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor 1 de complemento solúvel (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednisona; orgoteína; glicosaminoglicano polissulfato; minociclina (MINOCIN®); anticorpos anti-IL2R; lipídeos marinhos e botânicos (ácidos graxos de peixe e de semente de planta); auranofina; fenilbutazona; ácido meclofenâmico; ácido flufenâmico; globulina imune intravenosa; zileutona; ácido micofenólico (RS-61443); tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamicina); amiprilose (terafectina); cladribina (2-cloro-desóxi-adenosina); e azaribina. Combinações preferidas incluem um ou mais antagonistas de IL-17F polinucleotídeos inibitórios de IL-17R e/ou IL-17F; polipeptídeos IL-17R solúveis (incluindo seus fragmentos e/ou suas proteínas de fusão); anticorpos anti-IL-17F ou anti-IL-17R inibitórios; e/ou moléculas pequenas antagonísticas, etc.) em combinação com metotrexato ou lefunomidae, e em casos de artrite reumatóide moderada ou severa, ciclosporina.

Exemplos preferidos de inibidores para uso em combinação

com antagonistas de IL-17F para tratar distúrbios artríticos incluem antagonistas de TNF (e.g., anticorpos quiméricos, humanizados, de humano ou gerados *in vitro*, ou seus fragmentos ligantes em antígeno, que se ligam em TNF; fragmentos solúveis de um receptor de TNF, e.g., receptor de TNF de humano p55 ou p75 ou seus derivados, e.g., TNFR-IgG de 75 kd (proteína de fusão de IgG – receptor de TNF de 75 kD, ENBREL™), proteína de fusão de IgG – receptor de TNF p55; antagonistas de enzima TNF, e.g., inibidores de enzima conversora de TNFα (TACE)); antagonistas de IL-12, IL-15, IL-18, IL-22; agentes depletantes de célula-B e de célula-T (e.g., anticorpos anti-CD4 ou anti-CD22); inibidores de molécula pequena, e.g., metotrexato e leflunomida; sirolimus (rapamicina - RAPAMUNE®) e seus análogos, e.g., inibidores de CCI-779; cox-2 e cPLA2; NSAIDs; inibidores de p38, inibidores de TPL-2, Mk-2 e NFκB; RAGE ou RAGE solúvel; inibidores de P-selectina ou PSGL-1 (e.g., inibidores de molécula pequena, anticorpos para os mesmos, e.g., anticorpos para P-seletina); agonistas de receptor beta de estrogênio (ERB) ou antagonistas de ERB-NFκB. Agentes terapêuticos adicionais mais preferidos que podem ser co-administrados e/ou co-formulados com um ou mais antagonistas de IL-17F (e.g. polinucleotídeos inibitórios de IL-17R e/ou IL-17F; polipeptídeos IL-17R solúveis (incluindo seus fragmentos e/ou suas proteínas de fusão); anticorpos anti-IL-17F ou anti-IL-17R inibitórios; e/ou moléculas pequenas antagonísticas, etc.) incluem um ou mais de: um fragmento solúvel de um receptor de TNF, e.g., receptor de TNF de humano p55 ou p75 ou seus derivados, e.g., TNFR-IgG de 75 kd (proteína de fusão de IgG – receptor de TNF de 75 kD, ENBREL™); metotrexato, leflunomida, ou um sirolimus (rapamicina) ou um seu análogo, e.g., CCI-779.

Exemplos não limitantes de agentes para o tratamento ou a prevenção de esclerose múltipla com os quais antagonistas de IL-17F podem ser combinados incluem os seguintes: interferons, e.g., interferon-alfa1a (e.g.,

AVONEX™; Biogen) e interferon-1b (BETASERON™ Chiron/Berlex); Copolímero 1 (Cop-1; COPAXONE™ Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxigênio hiperbárico, imunoglobulina intravenosa; cladribina; antagonistas de TNF como aqui descritos; corticosteróides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; ciclosporina A, metotrexato; 4-amino-piridina; e tizanidina. Antagonistas adicionais que podem ser usados em combinação com antagonistas de IL-17F incluem anticorpos para ou antagonistas de outras citocinas de humano ou fatores de crescimento de humano, por exemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-11, GM-CSF, FGF, e PDGF. Antagonistas de IL-17F como aqui descritos podem ser combinados com anticorpos para moléculas de superfície de célula tais como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 ou seus ligantes. Os antagonistas de IL-17F também podem ser combinados com agentes, tais como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSAIDs, por exemplo, ibuprofeno, corticosteróides tal como prednisolona, inibidores de fosfodiesterase, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interferem com a sinalização por citocinas pró-inflamatórias como aqui descritos, inibidores de enzima conversora de IL-Ib (e.g., Vx740), anti-P7s, PSGL, inibidores de TACE, inibidores de sinalização de célula-T tais como inibidores de cinase, inibidores de metaloproteinase, sulfasalazina, azatloprina, 6-mercapto-purinas, inibidores de enzima conversora de angiotensina, receptores de citocina solúveis e seus derivados, como aqui descritos, e citocinas antiinflamatórias (e.g., IL-4, IL- 10, IL-13 e TGF).

Exemplos preferidos de agentes terapêuticos para esclerose múltipla com os quais os antagonistas de IL-17F podem ser combinados incluem interferon-β, por exemplo, IFNβ-1-a e IFNβ-1b; copaxona, corticosteróides, inibidores de IL-I, inibidores de TNF, anticorpos para ligante

CD40 e CD80, antagonistas de IL-12.

Exemplos não limitantes de agentes para tratamento ou prevenção de doença inflamatória intestinal (e.g., doença de Crohn, colite ulcerativa) com os quais um antagonista de IL-17F (e.g. polinucleotídeos inibitórios de IL-17R e/ou IL-17F; polipeptídeos IL-17R solúveis (incluindo seus fragmentos e/ou suas proteínas de fusão); anticorpos anti-IL-17F ou anti-IL-17R inibitórios; e/ou moléculas pequenas antagonísticas, etc.) pode ser combinado incluem os seguintes: budenosida; fator de crescimento epidérmico; corticosteróides; ciclosporina; sulfasalazina; amino-salicilatos; 6-mercapto-purina; azatioprina; metronidazol; inibidores de lipoxigenas; mesalamina; olsalazina; balsalazida; 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 de piridinil-imidazol; antagonistas de TNF como aqui descritos; citocinas IL-4, IL-10, IL-13 e/ou TGFβ ou seus agonistas (e.g., anticorpos agonistas); IL-11; pró-drogas glicuronida- ou dextrana-conjugadas de prednisolona, dexametasona ou budesonida; ICAM-1 anti-sentido fosforotioato oligodesoxinucleotídeos (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor 1 de complemento solúvel (TP10; T Cell Sciences, Inc.); mesalazina de liberação lenta; metotrexato; antagonistas de fator ativador de plaqueta (PAF); ciprofloxacina; e lignocaína.

Em uma modalidade, um antagonista de IL-17F (e.g. polinucleotídeos inibitórios de IL-17R e/ou IL-17F; polipeptídeos IL-17R solúveis (incluindo seus fragmentos e/ou suas proteínas de fusão); anticorpos anti-IL-17F ou anti-IL-17R inibitórios; e/ou moléculas pequenas antagonísticas, etc.) pode ser usado em combinação com um ou mais anticorpos direcionados em outros alvos envolvidos em regulação de respostas imunes, e.g., rejeição de transplante. Exemplos não limitantes de agentes para respostas imunes de prevenção ou tratamento com os quais um

antagonista de IL-17F pode ser combinado incluem os seguintes: anticorpos contra outras moléculas de superfície celular, incluindo mas não limitadas a CD25 (receptor-a de interleucina-2), CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4 (CD80 (B7.1), e.g., CTLA4 Ig – abatacepte (ORENCIA®), ICOSL, ICOS e/ou CD86 (B7.2). Em ainda outra modalidade, um antagonista de IL-17F é usado em combinação com um ou mais agentes imunossupressores gerais, tal como ciclosporina A ou FK506.

Em outras modalidades, antagonistas de IL-17F são usados como adjuvantes de vacina contra doenças inflamatórias, e.g. inflamação das vias aéreas, e.g., m pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos. A combinação de adjuvantes para o tratamento destes tipos de distúrbios é adequada para uso em combinação com uma ampla variedade de antígenos. O antígeno pode compreender peptídeos ou polipeptídeos derivados de proteínas, bem como fragmentos de qualquer um dos seguintes: sacarídeos, proteínas, polinucleotídeos ou oligonucleotídeos, anti-antígenos, proteína de peptídeo amilóide, antígenos de transplante, alérgenos, ou outros componentes macromoleculares. Em alguns casos, mais do que um antígeno é incluído na composição antigênica.

Por exemplo, vacinas desejáveis para moderar respostas aos alérgenos em um hospedeiro vertebrado, que contém as combinações de adjuvantes desta invenção, incluem aquelas contendo um alérgeno e seu fragmento. Exemplos de tais alérgenos são descritos em Patente U.S. de No. 5.830.877 e Pedido de Patente Internacional Publicado de No. WO 99/51259; que são pode meio deste aqui incorporados em suas totalidades como referências, e incluem pólen, venenos de inseto, raiva animal, esporos fúngicos e drogas (tal como penicilina). As vacinas interferem com a produção de anticorpos IgE, uma causa conhecida de reações alérgicas. Em outro exemplo, vacinas desejáveis para prevenir ou tratar doença

caracterizada por deposição de amilóide em um hospedeiro vertebrado, que contém as combinações de adjuvantes desta invenção, incluem aquelas contendo porções de proteína de peptídeo amilóide (APP). Esta doença é referida de modo variável a mal de Alzheimer, doença amilóide ou amiloidogênica. Assim, as vacinas desta invenção incluem as combinações de adjuvantes desta invenção mais peptídeo Aβ e anticorpos para o peptídeo Aβ ou seus fragmentos.

Métodos de 1) infra-regulação de função celular apresentando antígeno; e 2) terapia de combinação para manejo de imunossupressão são bem conhecidos na arte (veja, e.g., Xiao et al. (2003) *BioDrugs* 17:103-11; Kuwana (2002) *Hum. Immunol.* 63:1156-63; Lu et al. (2002) *Transplantation* 73:S19-S22; Rifle et al. (2002) *Transplantation* 73:S1-S2; Mancini et al. (2004) *Crit. Care. Nurs. Q.* 27:61-64).

Outro aspecto da presente invenção conseqüentemente refere-se aos kits para realizar a administração de antagonistas de IL-17F (e.g., polinucleotídeos inibitórios de IL-17R e/ou IL-17F; polipeptídeos IL-17R solúveis (incluindo seus fragmentos e/ou suas proteínas de fusão); anticorpos anti-IL-17F ou anti-IL-17R inibitórios; e/ou moléculas pequenas antagonísticas, etc.). Em uma modalidade, o kit compreende um ou mais agentes ligantes formulados em um carreador farmacêutico, e pelo menos um agente, e.g., agente terapêutico, formulado conforme apropriado, em uma ou mais preparações farmacêuticas separadas.

Os conteúdos inteiros de todas as referências, patentes, e pedidos de patente publicados citados em todo este pedido são por meio deste aqui incorporados como referências.

EXEMPLOS

Os seguintes Exemplos proporcionam modalidades ilustrativas da invenção e de nenhum modo limitam a invenção. Uma pessoa ordinariamente experiente na arte reconhecerá que numerosas outras

modalidades estão incluídas dentro do escopo da invenção.

Exemplo 1: Materiais e Métodos

Exemplo 1.1: Cultura de Célula Primária de Tecidos das Vias Aéreas de Humano

Células epiteliais bronquiais de humano (HBE) foram isoladas de pulmões nativos de recipientes de transplante, ou de seções não usadas de pulmões de doador como previamente descrito (Devor et al. (2000) *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 279:C461-79). As vias aéreas foram dissecadas do tecido adventício circundante, e deixadas dentro de um meio essencial mínimo tamponado com HEPES gelado contendo penicilina, estreptomicina, e anfotericina B. Após múltiplas lavagens com solução salina balanceada de Hank (HBSS), fria, segmentos cartilaginosos das vias aéreas foram cortados longitudinalmente, e incubados durante a noite a 4°C em Protease XIV 0,1% (Sigma, St. Louis, MO). Células epiteliais das vias aéreas foram obtidas por raspagem cuidadosa do epitélio com a extremidade cega do fórceps. As células recuperadas foram plaqueadas sobre placas de cultura de tecido revestidas com colágeno placentário de humano de tipo IV (Sigma) em mistura 1:1 de meio de crescimento epitelial bronquial (BEGM; Clonetics Corp., San Diego, CA) e Meio Livre de Soro-Queratinócito (K-SFM; Invitrogen Corp.). Após 5-7 dias sob estas condições, as células foram tripsinizadas, lavadas em HBSS e semeadas sobre filtros Corning/CoStar Transwell revestidos de colágeno placentário de humano de tipo IV a 100% de confluência em BEGM/K-SFM. Após 24 h, as células foram posicionadas na interface de ar-líquido pela remoção de meio apical do filtro Transwell, e meio basolateral foi substituído por DMEM/F12 (Invitrogen Corp.) contendo 2% de UltroSer G (BioSepra) para promover diferenciação. Sob condições de cultura bifásica, foi observado um epitélio mucociliar com a formação de cílios e grânulos secretores de muco. As culturas foram privadas de soro 24 h antes do início

do tratamento com citocina.

Exemplo 1.2: Tratamento com Citocinas e Anticorpo

IL-17A e IL-17F (R&D Systems, Minneapolis, MN) foram dissolvidos em F12/DMEM e adicionados diretamente em ambas as superfícies apical e/ou basal de culturas de HBE primária em concentrações finais de 0, 1, 10 ou 100 ng/ml. TNF-α (Biosource International, Camarillo, CA) foi usado em uma concentração final de 1 ng/ml. Para testar os efeitos inibitórios de um anticorpo monoclonal anti-receptor de IL-17 de humano (R&D Systems) sobre a bioatividade de IL-17F, o anticorpo foi adicionado nas culturas em uma concentração de 2 μg/ml, que é dez vezes maior do que a ED50, e foi determinada a secreção de citocina, quimiocina e/ou fator de crescimento por fibroblastos dérmicos de humano. Quimera de IL-17R recombinante de humano: Fc (R&D Systems) foi usada a 1 μg/ml. Em estudos de neutralização de receptor de TNF, anti-TNF-RI de humano (Biosource International) foi usado em uma concentração de 10 μg/ml e/ou quimera de TNF recombinante de humano – RII:Fc (R&D Systems) foi usada em uma concentração de 0,5 μg/ml.

Exemplo 1.3: Isolamento de RNA/Análise por RT-PCR de Expressão de Gene DEFB4

RNA foi extraído de culturas após 24 h de incubação usando reagente TriZOL LS (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. Taqman PCR foi realizada para examinar a expressão de gene de Defensina-4 Beta de Humano (DEFB104) após transcrição reversa e amplificação em um Sistema de Detecção de Seqüência ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems). Iniciadores gene-específicos para DEFB104 foram adquiridos de Applied Biosystems. A reação PCR foi realizada em placas de reação óptica de 96 cavidades e cada cavidade contendo uma mistura reacional de 50 μL com 25 μL de SYBR Green PCR Master Mix, 0,5 μL de cada iniciador (concentração final: 900 nM), 19 μL de água e 5 μL de amostras de cDNA. O valor de ciclo

limiar (Ct) reflete o número de ciclos no qual a fluorescência gerada dentro de uma reação ultrapassa dois desvios padrão. A quantidade relativa de mRNA de cada amostra foi calculada baseado em seu Ct em comparação com o Ct de um gene de manutenção, 18s. Os resultados são apresentados como nível de expressão comparativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$). PCR em Tempo Real foi conduzida três vezes para cada amostra e o valor médio foi calculado. Este procedimento foi realizado em pelo menos 3 experimentos independentes.

Exemplo 1.4: Medições por Bio-Plex e ELISA

Um ensaio Bio-Plex de citocina de humano (BIO-RAD) para quantificação simultânea de IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, MCP-1, MIP-1β, e TNF-α em meios apical e basolateral foi conduzido de acordo com o procedimento recomendado. G-CSF e GRO-α foram medidos usando kits de ELISA separados (R&D Systems) seguindo as instruções do fabricante. IL-17F de humano foi medida usando anticorpos proporcionados por Wyeth (Cambridge, MA).

Exemplo 1.5: Imuno-histoquímica

Anticorpo anti-IL-17R de humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) foi usado para caracterizar a expressão de receptor de IL-17 sobre células de epitélio respiratório de seções de tecido de pulmão de humano. O manchamento foi realizado usando anticorpo de coelho anti-cabra conjugado com Cy-3 como anticorpo secundário (Sigma) e fluoromount G como meio de montagem. Soro de coelho foi usado para bloqueio de pré-manchamento. As figuras de manchamento foram capturadas por uma câmara acoplada em um microscópio fluorescente Olympus e imagens foram adicionalmente analisadas com Olympus Software (Olympus, Melville, NY).

Para caracterizar a expressão de receptores I de TNF (TNF-RI) e II de TNF (TNF-RII) sobre células HBE polarizadas crescidas sobre interface de ar-líquido, anticorpos monoclonais de camundongo anti-TNF-RI

de humano e anti-TNF-RII de humano (R&D Systems) foram usados como anticorpos primários e anticorpo de cabra Alexa 488 g (Molecular Probes, Eugene, OR) foi usado como um anticorpo secundário. Prolong Gold anti-desbotamento com DAPI (Molecular Probes) foi usado como meio de montagem. Imagens foram capturadas por uma câmera acoplada em um microscópio de imagem universal Axioplan 2, e adicionalmente analisadas com programa de computador Slidebook 4.0 (ambos da Intelligent Imaging Innovations, Denver, CO) e programa de computador Metamorph (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA).

Exemplo 1.6: Indivíduos Humanos

Pacientes adultos com fibrose cística (idade média de 22 anos) colonizados com *P. aeruginosa* sofrendo de exacerbação pulmonar requerendo hospitalização foram inscritos em um estudo para medir biomarcadores de inflamação em saliva no dia 1 de hospitalização, e 10 e 20 dias após a iniciação com antibióticos e terapia respiratória intensificada. Amostras de saliva foram processadas usando Sputolysin (Behring Diagnostics, Somerville, NJ). Resumidamente, 1 ml de Sputolysin 10% foi adicionado por 1 mg de saliva, a amostra foi incubada por 5 min a 37°C com agitação vigorosa e misturação vigorosa com pipeta de transferência. Amostras foram então centrifugadas a 2.000 rpm por 5 min a 4°C e os sobrenadantes foram ensaiados por Bio-Plex e ELISA.

Exemplo 1.7: Análise por *Western Blot*

Amostras para *Western blot* da saliva processada foram separadas (12,4 μg de proteína por vala) sobre SDS-PAGE. Proteínas separadas sobre geles foram transferidas para cima de membranas Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA) a 140 mA por 1 h. As membranas foram bloqueadas durante a noite a 4°C com PBS contendo 5% de BSA. Os *blots* foram corados com anticorpo de coelho anti-p19 de humano por 1 h na temperatura ambiente e revelados por incubação com uma IgG de cabra anti-

coelho conjugada com fosfatase alcalina secundária (Bio-Rad) e reagente BCIP/NBT (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Exemplo 1.8: Análise Estatística

Dados foram analisados usando programa de computador estatístico StatView (Brainpower Inc., Calabasas, CA). Comparações entre grupos onde dados estavam normalmente distribuídos foram feitas com o teste-t de Student, e comparações entre múltiplos grupos ou dados não paramétricos foram feitas com análise de variância. Teste de Scheffe foi usado como o teste *post hoc*. O teste de Mann-Whitney ou teste de amostra pareada de Wilcoxon foi empregado para fazer comparações ordinárias. Significância foi aceita em um valor de $p < 0,05$.

Exemplo 2: IL-17F Supra-regula Expressão de G-CSF, de GRO-α e de MCP-1 por Células Epiteliais Bronquiais de Humano

Usando os ensaios Bio-Plex e ELISA como descritos no Exemplo 1.1, ambos os meios apical e basolateral foram selecionados para citocinas, quimiocinas e/ou fatores de crescimento que podem ser regulados por IL-17A e IL-17F em células epiteliais bronquiais primárias de humano crescidas na interface de ar-líquido (veja Exemplo 1). Em adição às IL-8 e IL-6, dois fatores já relatados como sendo induzidos por IL-17A (dados não mostrados), uma indução significativa em secreção de G-CSF, GRO-α e de MCP-1 foi detectada a 24 h em células HBE primárias tratadas com IL-17A e IL-17F (Tabela 2). Os dados são mostrados em gráfico como indução dobrada por cauda da variabilidade na quantidade absoluta de fatores de crescimento secretados de doadores de via aérea diferentes. Estes efeitos foram dependentes de dose (HG: 1A; Tabela 2) com um efeito máximo observado em uma concentração de 100 ng/ml. IL-17A foi mais potente do que IL-17F em uma base de peso por peso para induzir G-CSF, GRO-α e MCP-1 a 24 h. Um curso de tempo realizado com 10 ng/ml de IL-17A e IL-17F mostrou que os efeitos de IL-17A e IL-17F sobre G-CSF, GRO-α e MCP-1 foram

dependentes do tempo (FIG: 1B), com um efeito máximo observado a 24 h. Baseado nestes estudos cinéticos, os seguintes parâmetros foram realizados em sua maioria usando 10 ng/ml de IL-17A ou IL-17F e um tempo de incubação de 24 h.

Tabela 2: Concentração de G-CSF, GRO-α e MCP-1 em Meio Basolateral após 24 h de Estimulação de HBE com IL-17A e Il-17F

IL-17A	G-CSF	GRO-α	MCP-1
0 ng/ml	401.2 ± 32.24	2012.1 ± 102.34	22.01 ± 1.98
1 ng/ml	829.56 ± 128.38	8412.1 ± 503.02	82.8 ± 6.6
10 ng/ml	2029.3 ± 192.57	11144.7 ± 643.87	98.83 ± 6.16
100 ng/ml	3546.24 ± 296.88	15140.7 ± 1026.17	118.5 ± 8.8

IL-17F	G-CSF	GRO-α	MCP-1
0 ng/ml	401.2 ± 32.24	2012.1 ± 102.34	22.01 ± 1.98
1 ng/ml	655.4 ± 44.13	5798.1 ± 382.30	46.75 ± 2.64
10 ng/ml	1482 ± 112.33	9729.2 ± 804.84	43.36 ± 4.13
100 ng/ml	2236 ± 164.49	14175.4 ± 865.20	68.5 ± 6.61

Exemplo 3: IL-17F é Sinérgica com TNF-α para Indução de Secreção de G-CSF e de GRIO-α

Visto que tem sido relatada a sinergia de IL-17A com TNF-α, foi determinado o efeito da combinação de IL-17F (10 ng/ml) e TNF-α (1 ng/ml) para supra-regular a secreção de G-CSF e de GRO-α por células HBE primárias. Concentrações ótimas de citocinas têm sido determinadas em experimentos anteriores (dados não mostrados). Células HBE mostraram um efeito sinérgico em secreção de G-CSF e de GRO-α quando IL-17F foi combinada com TNF-α por 24 h (FIG.s 2A e 2B). Este efeito sinérgico foi inibido por pré-incubação da mistura de citocina estimulante e mAb anti-IL-17R, mas não com uma proteína quimera de IL-17R:Fc solúvel ou umAb de controle adaptado a isótipo (dados de isótipo não mostrados). Contudo, ambas as proteínas mAb anti-IL-17R e IL-17R:Fc solúvel foram efetivas na inibição de aumentos em G-CSF induzidos por IL-17A (FIG: 2C). Estes dados sugerem fortemente que IL-17R é crítico para ambas as respostas de G-CSF induzidas por IL-17A e

IL-17F.

Exemplo 4: Secreção de GRO-α e de G-CSF Induzida por IL-17A e IL-17F é Diminuída por Ab anti-receptor de IL-17

Para determinar a polarização de secreção de GRO-α e de G-CSF em resposta à IL-17A e à IL-17F, células HBE primárias foram estimuladas com IL-17A e IL-17F por 24 h, e GRO-α e G-CSF foram ensaiados em fluido apical ou basolateral. Ambos GRO-α e G-CSF foram secretados tanto apical quanto basolateralmente,com GRO-α mostrando uma indução maior em secreção basolateral comparado com G-CSF (FIG. 3). Pré-incubação com Ab anti-IL-17R significativamente aboliu a indução de secreção de GRO-α e de G-CSF mediada por ambas IL-17A e IL-17F em meios apical e basolateral (FIG. 3). Estes resultados confirmam a noção de que IL-17R é requerido para a atividade de qualquer uma de IL-17A ou IL-17F sobre células HBE para induzir a produção de G-CSF e de GRO-α.

Exemplo 5: IL-17A e IL-17F Supra-regulam a Expressão de DEFB104

IL-17A e IL-17F (ambas a 10 ng/ml) foram adicionadas em culturas de HBE, RNA foi extraído 24 h mais tarde, e expressão de mRNA de defensina-4 Beta de humano (gene DEFB104) foi analisada por RT-PCR em tempo real e normalizada para RNA ribossômico 18s. DEFB104 foi supra-regulada por ambas IL-17A e IL-17F em um modo dependente de dose (FIG. 4A), mas IL-17A teve indução de vezes maior do que IL-17F a 10 ng/ml por 24 h (ΔΔCT: -3,34+0,44 SEM vs. -2,23+0,31 SEM, respectivamente). Pré-incubação com 2 μg/ml de anticorpo anti-IL-17R parcialmente inibiu o efeito de 100 ng/ml de IL-17A e de 100 ng/ml de IL-17F em 62,5% e 77,6%, respectivamente, indicando que sinalização de receptor de IL-17 também é requerida para a supra-regulação de DEFB104 por ambas as citocinas (FIG. 4B). Finalmente, foram avaliados os efeitos de combinação de IL-17A (1 ng/ml) e IL-17F (10 ng/ml) com TNF-α (1 ng/ml) para indução de DEFB104. Um efeito aditivo foi verificado com a combinação de qualquer um de IL-17A

e TNF-α, ou IL-17F e TNF-α (FIG: 4C). A combinação de ambas IL-17A e IL-17F também produziu um efeito aditivo sobre a indução de DEFB104 (FIG. 4C).

Exemplo 6: Receptor de IL-17 é Funcionalmente Expressado sobre a Superfície Basolateral de Células Epiteliais Respiratórias

Manchamento imuno-histoquímico para receptor de IL-17 foi realizada sobre seções congeladas de espécimes de pulmão de humano. Em contraste com uma seção de controle que não mostrou manchamento não específico, foi verificado que IL-17R foi expressado em células epiteliais respiratórias bem como em células parenquimais de pulmão e localizado principalmente na superfície basolateral de células epiteliais respiratórias (dados não mostrados). Para confirmar as descobertas imuno-histoquímicas, foi planejado um experimento no qual células HBE foram incubadas com IL-17A ou IL-17F em meios basolateral ou apical por 24 h. Meio basolateral condicionado para G-CSF e GRO-α foi ensaiado, e foi verificado que ambos os fatores de crescimento foram supra-regulados quando IL-17A e IL-17F foram aplicadas em meio basolateral. Contudo, nenhuma indução de GRO-α ou G-CSF foi observada quando IL-17A ou IL-17F foi aplicada apicalmente (FIG. 5). Tomados juntos, estes dados sugerem fortemente que a bioatividade de IL-17F ocorre via sinalização através de IL-17R sobre o lado basolateral de células HBE.

Exemplo 7: TNF Receptores I e II estão Estrutural e Funcionalmente sobre a Superfície Basolateral de Células Epiteliais Respiratórias

Receptores I de TNF (TNF-RI) e II de TNF (TNF-RII) foram imuno-histoquimicamente corados sobre células HBR primárias polarizadas crescidas sobre membranas Transwell usando anticorpos monoclonais anti-TNF-RI de humano e anti-TNF-RII de humano. Foi verificado que ambos os receptores são expressados em células HBE (dados não mostrados). Como um controle negativo, um filtro foi apenas corado com anticorpo secundário, e

não mostrou manchamento não específico (dados não mostrados). Ainda mais uma reconstrução de eixo-ZX mostrou que TNF-RI e TNF-RII estavam localizados nas membranas laterais de células HBE, abaixo das junções íntimas (dados não mostrados).

Para confirmar as descobertas imuno-histoquímicas, foi planejado um experimento no qual as células HBE foram incubadas com IL-17F e/ou TNF-α em meio basolateral ou apical por 24 h. Meio basolateral condicionado foi ensaiado. G-CSF foi supra-regulado quando IL-17F e/ou TNF-α foi aplicado em meio basolateral mas indução de G-CSF não foi observada quando IL-17F e/ou TNF-α foi aplicado apicalmente (FIG. 6A). Tomados juntos, estes dados sugerem que a sinalização que acarreta sinergia entre IL-17F e TNF-α ocorre basolateralmente em células HBE.

Para avaliar a importância de receptores I e II de TNF sobre a sinalização requerida para sinergia entre IL-17F e TNF-α, células HBE foram pré-incubadas com qualquer um de ou ambos anti-TNF-RI de humano e quimera de TNF de humano - RII:Fc. O efeito sinérgico sobre secreção de G-CSF após combinação de IL-17F e TNF-α foi bloqueado por anti-TNF de humano - RI e por quimera de TNF recombinante - RII:Fc (FIG. 6B). Surpreendentemente, o nível de G-CSF secretado pelas células HBE em resposta à combinação de IL-17F e TNF-α na presença de qualquer um de anti-TNF de humano -RI ou quimera de TNF-RII:Fc foi menor do que o nível de G-CSF secretado por células HBE em resposta ao estímulo de IL-17F (FIG. 6B), sugerindo que até mesmo quando IL-17F é aplicada sozinha em culturas de HBE, ela tem um efeito sinérgico por interação com TNF-α que é tonicamente secretado por estas células. Apenas incubação com a quimera de TNFRII:Fc reduziu a secreção de G-CSF pelas células HBE para um nível aproximadamente equivalente ao nível de G-CSF secretado pelas células HBE em resposta ao estímulo por IL-17A (FIG. 6C).

Exemplo 8: Níveis de IL-17A e de IL-17F são Aumentados em Pacientes com Fibrose Cística Sofrendo de Exacerbação Pulmonar

Fibrose cística (CF) é uma doença pulmonar caracterizada por infecção endobronquial persistente e inflamação pulmonar neutrofílica (Karp et al. (2004) *Nat. Immunol.* 5:388-92) e níveis altos de CXCL8 em saliva (Smountas et al. (2004) *Clin. Biochem* 37:1031-36; Sagel et al. (2001) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164:1425-31). Visto que Ye e colegas ((2001) *J. Exp. Med.* 194:519-527) previamente mostraram que sinalização de IL-17R é crítica para expressão de CXCL2 em pulmão de murino em resposta à infecção Gram-negativa, foi feita a hipótese de que IL-17A e IL-17F seriam supra-reguladas na saliva de pacientes com CF sofrendo de exacerbação pulmonar. Na confirmação disto, estudos preliminares demonstraram níveis de IL-17A mais altos em pacientes com CF submetendo-se à broncoscopia para exacerbação pulmonar contínua comparados com controles com tosse crônica devido à asma e doença de refluxo gastroesofágico (dados não mostrados). Visto que estas amostras puderam ser sujeitas à seleção tendenciosa devido à decisão de realizar clinicamente a broncoscopia, IL-17A, IL-17F e o mediador proximal IL-23 (p19) em amostras de saliva de oito pacientes adultos (idade média: 22 anos) com CF sofrendo exacerbação pulmonar (requerendo hospitalização e antibióticos intravenosos) foram escolhidas para serem investigadas. No dia 1 de hospitalização, níveis aumentados de IL-17A e IL-17F foram prontamente detectáveis quando comparados com amostras de saliva coletadas de quatro indivíduos não diagnosticados com CF (59,58 pg/ml± 5,.22 (S.E.M.) vs. 4,17±2,13 para IL-17A; e 84,67±10,87 vs. 20,1±3,25 para IL-17F). Saliva foi coletada e analisada serialmente durante o tratamento com antibiótico. Concentrações de IL-17A e de IL-17F diminuíram dramaticamente próximo do dia 20 (FIG. 7A), alcançando níveis similares em indivíduos não diagnosticados com CF. Um painel de 18 outras citocinas na saliva destes pacientes foi medido usando

glóbulos de citocina Luminex, e foi verificado que IL-8, IL-6, G-CSF, GRO-α, MCP-1, MIP-1β, TNF-α, GM-CSF e IL-1β também estavam impressivamente reduzidos próximo ao dia 20 (veja, e.g., FIG: 7B), mostrando um padrão total similar àquele visto para IL-17A e IL-17F. Padrões de expressão similares foram vistos quer as concentrações de citocina/quimiocina tenham sido corrigidas quer não para o conteúdo de proteína total. Por fim, como IL-23, um produto largamente de macrófagos e células dendríticas, é um regulador proximal de IL-17A e IL-17F, análise por *Western blot* das amostras de saliva [obtidas de três pacientes com fibrose cística sofrendo de exacerbação pulmonar antes do tratamento com antibióticos (dia 1 de hospitalização) e após 20 dias de tratamento com antibiótico] foi realizada para detectar a presença de proteína IL-23 p19. IL-23 foi detectada em todos os pacientes com CF sofrendo de exacerbação pulmonar; em dois de três pacientes, o nível de IL-23 foi mais alto no dia 1 de hospitalização e diminuiu próximo ao dia 20 (dados não mostrados).

Exemplo 9: Discussão

IL-17A e IL-17F são produtos de células T ativadas (Moseley (2003) Cytokine *Growth Factor Rev.* 14:155-74) em resposta a ambos os estímulos infecciosos (Ye et al. (2001) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25:335-40) e antigênicos (Hellings et al. (2003) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28:42-50). Lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas parece induzir IL-17A e IL-17F através de rotas dependentes de IL-23 e dependentes de TLR4 (Happel et al. (2003) *J Immunol.* 170:4432-36; Aggarwal et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:1910-14; Linden e Adachi (2002) *Allergy* 57:769-75). Sobreexpressão de IL-17A ou de IL-17F no pulmão resulta na indução de quimiocinas CXC e recrutamento de neutrófilos (Ye et al. (2001) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25:335-40; Hurst et al. (2002). *J. Immunol.* 169:443-53). Deficiência de sinalização de IL-17R através de seleção de gene resulta em uma suscetibilidade intensificada às infecções pulmonares bacterianas

Gram-negativas com defeitos em ambos granulopoiese e recrutamento de neutrófilos pulmonares (Ye et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194:519-28). Também tem sido relatado que inibição de IL-17A diminui o recrutamento de neutrófilos pulmonares induzido por lipopolissacarídeo (Laan et al. (1999) *J. Immunol.* 162:2347-52; Ferretti et al. (2003) *J. Immunol.* 170:2106-12). O defeito em granulopoiese em camundongos nocauteados IL-17R está associado com uma redução maior do que 90% em liberação de G-CSF (Ye et al. (2001) *J. Exp. Med.* 194:519-28). Além disso, sobreexpressão sistêmica de IL-17A resulta em uma indução marcada em granulopoiese, que é, em parte, dependente de G-CSF (Schwarzenberger et al. (1998) *J. Immunol.* 161:6383-89; Schwarzenberger et al. (2000) *J. Immunol.* 164:4783-89).

Para melhor definir o papel de IL-17A e de IL-17F na regulação de G-CSF e da quimiocina CXC GRO-α no pulmão, expressão de receptor de IL-17 em tecido pulmonar foi examinada, e expressão significativa de IL-17R em células epiteliais respiratórias basais foi verificada. Incubação de células HBE polarizadas com ambas IL-17A e IL-17F resultaram em perfis similares de respostas de citocina conforme medido por Bio-Plex com a indução de IL-8 e IL-6 (dados não mostrados) em adição a G-CSF e GRO-α. Também foi demonstrado que há sinergia de IL-17F com TNF-α para adicionalmente induzir a produção de G-CSF e GRO-α pelas células epiteliais bronquiais isoladas de pulmão de humano. Em contraste a estas descobertas, Numasaki e colaboradores ((2004) *Immunol. Lett.* 95:97-104) relataram que IL-17F possui um efeito inibitório sobre a secreção de G-CSF induzida por TNF-α. Contudo, o estudo de Numasaki foi realizado em células endoteliais microvasculares pulmonares, que podem diferir nesta resposta.

Parece que ambas IL-17A e IL-17F envolvem o receptor de IL-17 na regulação de secreção de GRO-α e G-CSF, porque um anticorpo monoclonal específico para o IL-17R significativamente atenuou a liberação

destas citocinas em resposta à IL-17A e à IL-17F. Contudo, devido à eficiência de ligante baixa com este receptor (Hymowitz et al. (2001) *EMBO J.* 20:5332-41), a possibilidade de co-receptores envolvidos em sinalização de IL-17F não pode ser excluída (Kolls e Linden (2004) *Immunity* 21:467-76). Tem sido recentemente mostrado que IL-17F se liga *in vitro* em IL-17RC (Kuestner et al. (2005) "Keystone Symposia: Cytokines, Disease, and Therapeutic Intervention", 49 (*Abstract*)). Na conformação destes dados, um IL-17R solúvel foi eficiente na inibição da bioatividade de IL-17A mas não de IL-17F em células HBE. Estes dados sugerem que ligação de IL-17F é diferente para o receptor de membrana celular, ou que um complexo de co-receptor envolvendo IL-17R é requerido para respostas de IL-17F. Outra possibilidade é a reatividade cruzada de mAb para IL-17RC; contudo isto é improvável, porque homologia de IL-17RC para com IL-17R é apenas de 15% (Kolls (2004) *Immunity* 21:467-76)). Além disso, a bioatividade de IL-17A, IL-17F, e TNF-α foi mais alta quando os ligantes foram aplicados basolateralmente, sugerindo que sinalização de IL-17A, IL-17F e TNF-α funcional provavelmente ocorre através da superfície basolateral de células epiteliais das vias aéreas. Esta localização de receptor tem sentido teleológico, porque uma fonte potencial proeminente de IL-17A e IL-17F é células T ativadas que podem residir no espaço submucosal (Kolls e Linden (2004) *Immunity* 21:467-76). De fato, Langrish e colegas têm recentemente definido uma população de células ThIL-17 que co-expressam IL-17A e IL-17F bem como TNF-α (Langrish et al. (2005) *J. Exp. Med.* 201(2):233-40). Assim, células ThIL-17 podem representar uma população crítica de células que interagem com as células de epitélio bronquial de humano que medeiam respostas inflamatórias. Com o uso de TNF-α, foi demonstrado que TNF-RI é crítico para sinergia com IL-17A e IL-17F. Contudo, visto que as células HBE também expressam TNF-RII, estas células também respondem ao TNF de superfície celular expressado sobre ThIL-17, que preferivelmente se liga e

sinaliza via TNF-RII (Grell et al. (1995) *Cell* 83:793-802). De nota é o fato de que as concentrações usadas para gerar respostas de G-CSF e GRO-α em células HBE (veja FIG: 7) são aproximadamente 10-100 vezes maiores do que aquela detectada em saliva. Isto possivelmente reflete o fato de que as concentrações de tecido local no pulmão podem ser mais altas do que na saliva (que é rica em proteases), ou pelo fato de que IL-17A e IL-17F podem requerer citocinas sinérgicas tais como TNF-α para sinalizar na concentração de pg/ml (Kolls (2004) *Immunity* 21:467-76). O mecanismo de sinergia de TNF-α com IL-17A e IL-17F não tem sido completamente elucidado, mas um mecanismo pode envolver indução sinérgica de fatores de transcrição, tal como C/EBPdelta, que conduz a transcrição de gene subseqüente (Shen et al. (2005) *J. Leukoc. Biol.* 77:388-99).

Tem sido relatado que IL-17A é supra-regulada em muitas doenças autoimunes inflamatórias incluindo artrite reumatóide (Lubberts (2003) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 4:572-77), esclerose múltipla (Lock et al. *Nat. Med.* 8:500-08), e doença inflamatória intestinal (Fujino et al. (2003) *Gut* 52:65-70). Tem sido recentemente mostrado que IL-17A e IL-17F derivadas de célula T são reguladas por TLR4 sobre macrófagos e células dendríticas e subseqüente produção de IL-23 por estas células. Ainda mais, IL-17A e IL-17F possuem uma localização cromossômica similar e provavelmente resultam de um evento de duplicação de gene. Baseado nestes dados, a capacidade de IL-17A e de IL-17F de mediarem neutrofilia pulmonar (Laan et al. (1999) *J. Immunol.* 162:2347-52), e o fato de que inflamação crônica em CF é predominantemente neutrofílica, é provável que IL-17A e IL-17F desempenhem papéis na inflamação das vias aéreas no ambiente de infecções bacterianas Gram-negativas crônicas, tal como bronquioectasia ou fibrose cística (CF).

Para este fim, foi verificado que ambas IL-17A e IL-17F estavam elevadas na saliva de pacientes adultos com CF sofrendo de

exacerbação pulmonar. Além disso, elevação dos níveis de IL-17A e IL-17F estava associada com mediadores inflamatórios previamente identificados tais como IL-8 (Sagel et al. (2001) *Am. J. Respir. Grit. Care Med.* 164:1425-31) e G-CSF (Schuster et al. (1995) *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 252(suppl. 1):S59-S60), sugerindo que estes membros da família de IL-17 podem desempenhar papéis em recrutamento de neutrófilos contínuo para dentro das vias aéreas destes pacientes. Em adição, É postulado que IL-17A e IL-17F podem regular quimiocina CXC e liberação de G-CSF em pacientes com CF. Adicionalmente, IL-23p19 foi detectada em saliva concentrada em níveis de aproximadamente 100 ng/ml, cujos níveis estão bem dentro da faixa para efetuação de produção de IL-17 por célula T de humano (Eijnden et al. (2005) *Eur. J. Immunol.* 35:469-75).

Acredita-se que estes dados são os primeiros a medirem IL-17F em amostras clínicas. Visto que inflamação crônica é considerada crítica para perder função pulmonar no ambiente de fibrose cística, os dados aqui contidos sugerem que IL-17A e IL-17F são dois membros da família de IL-17 que representam alvos terapêuticos excelentes para antagonizarem inflamação mediada por neutrófilo. Além disso, uma estratégia que antagoniza sinalização de IL-17R pode provavelmente bloquear ambas as ações de IL-17A e de IL-17F.

LISTAGEM DAS SEQÜÊNCIAS

<110> Wyeth
University of Pittsburgh

<120> CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES IL-17F E IL-17R

<130> 01997.039300

<150> 60/653,186
<151> 2005-02-14

<160> 5

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1
<211> 492
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(492)

<400> 1

```
atg aca gtg aag acc ctg cat ggc cca gcc atg gtc aag tac ttg ctg       48
Met Thr Val Lys Thr Leu His Gly Pro Ala Met Val Lys Tyr Leu Leu
1               5                  10                  15

ctg tcg ata ttg ggg ctt gcc ttt ctg agt gag gcg gca gct cgg aaa       96
Leu Ser Ile Leu Gly Leu Ala Phe Leu Ser Glu Ala Ala Ala Arg Lys
            20                  25                  30

atc ccc aaa gta gga cat act ttt ttc caa aag cct gag agt tgc ccg      144
Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu Ser Cys Pro
        35                  40                  45

cct gtg cca gga ggt agt atg aag ctt gac att ggc atc atc aat gaa      192
Pro Val Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Asp Ile Gly Ile Ile Asn Glu
    50                  55                  60

aac cag cgc gtt tcc atg tca cgt aac atc gag agc cgc tcc acc tcc      240
Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu Ser Arg Ser Thr Ser
65                  70                  75                  80

ccc tgg aat tac act gtc act tgg gac ccc aac cgg tac ccc tcg gaa      288
Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro Asn Arg Tyr Pro Ser Glu
                85                  90                  95

gtt gta cag gcc cag tgt agg aac ttg ggc tgc atc aat gct caa gga      336
Val Val Gln Ala Gln Cys Arg Asn Leu Gly Cys Ile Asn Ala Gln Gly
            100                 105                 110

aag gaa gac atc tcc atg aat tcc gtt ccc atc cag caa gag acc ctg      384
Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Thr Leu
        115                 120                 125

gtc gtc cgg agg aag cac caa ggc tgc tct gtt tct ttc cag ttg gag      432
Val Val Arg Arg Lys His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe Gln Leu Glu
    130                 135                 140

aag gtg ctg gtg act gtt ggc tgc acc tgc gtc acc cct gtc atc cac      480
Lys Val Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Val Ile His
145                 150                 155                 160
```

cat gtg cag taa 492
His Val Gln

<210> 2
<211> 163
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Val Lys Thr Leu His Gly Pro Ala Met Val Lys Tyr Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ser Ile Leu Gly Leu Ala Phe Leu Ser Glu Ala Ala Ala Arg Lys
20 25 30

Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu Ser Cys Pro
35 40 45

Pro Val Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Asp Ile Gly Ile Ile Asn Glu
50 55 60

Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu Ser Arg Ser Thr Ser
65 70 75 80

Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro Asn Arg Tyr Pro Ser Glu
85 90 95

Val Val Gln Ala Gln Cys Arg Asn Leu Gly Cys Ile Asn Ala Gln Gly
100 105 110

Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Thr Leu
115 120 125

Val Val Arg Arg Lys His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe Gln Leu Glu
130 135 140

Lys Val Leu Val Thr Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Val Ile His
145 150 155 160

His Val Gln

<210> 3
<211> 3420
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (134)..(2734)

<400> 3

```
ggctggaagc cggaagcgag caaagtggag ccgactcgaa ctccaccggc acgagggcgg      60

aaaagaaagc ctcagaacgt tcgctcgctg cgtccccagc cggggccgag ccctccgcga     120

cgccacccgg gcc atg ggg gcc gca cgc agc ccg ccg tcc gct gtc ccg         169
               Met Gly Ala Ala Arg Ser Pro Pro Ser Ala Val Pro
               1               5                  10

ggg ccc ctg ctg ggg ctg ctc ctg ctg ctc ctg ggc gtg ctg gcc ccg       217
Gly Pro Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ala Pro
        15                  20                  25

ggt ggc gcc tcc ctg cga ctc ctg gac cac cgg gcg ctg gtc tgc tcc       265
Gly Gly Ala Ser Leu Arg Leu Leu Asp His Arg Ala Leu Val Cys Ser
    30                  35                  40

cag ccg ggg cta aac tgc acg gtc aag aat agt acc tgc ctg gat gac       313
Gln Pro Gly Leu Asn Cys Thr Val Lys Asn Ser Thr Cys Leu Asp Asp
45                  50                  55                  60

agc tgg att cac cct cga aac ctg acc ccc tcc tcc cca aag gac ctg       361
Ser Trp Ile His Pro Arg Asn Leu Thr Pro Ser Ser Pro Lys Asp Leu
                65                  70                  75

cag atc cag ctg cac ttt gcc cac acc caa caa gga gac ctg ttc ccc       409
Gln Ile Gln Leu His Phe Ala His Thr Gln Gln Gly Asp Leu Phe Pro
            80                  85                  90

gtg gct cac atc gaa tgg aca ctg cag aca gac gcc agc atc ctg tac       457
Val Ala His Ile Glu Trp Thr Leu Gln Thr Asp Ala Ser Ile Leu Tyr
        95                  100                 105

ctc gag ggt gca gag tta tct gtc ctg cag ctg aac acc aat gaa cgt       505
Leu Glu Gly Ala Glu Leu Ser Val Leu Gln Leu Asn Thr Asn Glu Arg
    110                 115                 120

ttg tgc gtc agg ttt gag ttt ctg tcc aaa ctg agg cat cac cac agg       553
Leu Cys Val Arg Phe Glu Phe Leu Ser Lys Leu Arg His His His Arg
125                 130                 135                 140

cgg tgg cgt ttt acc ttc agc cac ttt gtg gtt gac cct gac cag gaa       601
Arg Trp Arg Phe Thr Phe Ser His Phe Val Val Asp Pro Asp Gln Glu
                145                 150                 155

tat gag gtg acc gtt cac cac ctg ccc aag ccc atc cct gat ggg gac       649
Tyr Glu Val Thr Val His His Leu Pro Lys Pro Ile Pro Asp Gly Asp
            160                 165                 170

cca aac cac cag tcc aag aat ttc ctt gtg cct gac tgt gag cac gcc       697
Pro Asn His Gln Ser Lys Asn Phe Leu Val Pro Asp Cys Glu His Ala
        175                 180                 185

agg atg aag gta acc acg cca tgc atg agc tca ggc agc ctg tgg gac       745
Arg Met Lys Val Thr Thr Pro Cys Met Ser Ser Gly Ser Leu Trp Asp
    190                 195                 200

ccc aac atc acc gtg gag acc ctg gag gcc cac cag ctg cgt gtg agc       793
Pro Asn Ile Thr Val Glu Thr Leu Glu Ala His Gln Leu Arg Val Ser
205                 210                 215                 220

ttc acc ctg tgg aac gaa tct acc cat tac cag atc ctg ctg acc agt       841
Phe Thr Leu Trp Asn Glu Ser Thr His Tyr Gln Ile Leu Leu Thr Ser
                225                 230                 235

ttt ccg cac atg gag aac cac agt tgc ttt gag cac atg cac cac ata       889
Phe Pro His Met Glu Asn His Ser Cys Phe Glu His Met His His Ile
            240                 245                 250
```

```
cct gcg ccc aga cca gaa gag ttc cac cag cga tcc aac gtc aca ctc      937
Pro Ala Pro Arg Pro Glu Glu Phe His Gln Arg Ser Asn Val Thr Leu
        255                 260                 265

act cta cgc aac ctt aaa ggg tgc tgt cgc cac caa gtg cag atc cag      985
Thr Leu Arg Asn Leu Lys Gly Cys Cys Arg His Gln Val Gln Ile Gln
    270                 275                 280

ccc ttc ttc agc agc tgc ctc aat gac tgc ctc aga cac tcc gcg act     1033
Pro Phe Phe Ser Ser Cys Leu Asn Asp Cys Leu Arg His Ser Ala Thr
285                 290                 295                 300

gtt tcc tgc cca gaa atg cca gac act cca gaa cca att ccg gac tac     1081
Val Ser Cys Pro Glu Met Pro Asp Thr Pro Glu Pro Ile Pro Asp Tyr
                305                 310                 315

atg ccc ctg tgg gtg tac tgg ttc atc acg ggc atc tcc atc ctg ctg     1129
Met Pro Leu Trp Val Tyr Trp Phe Ile Thr Gly Ile Ser Ile Leu Leu
            320                 325                 330

gtg ggc tcc gtc atc ctg ctc atc gtc tgc atg acc tgg agg cta gct     1177
Val Gly Ser Val Ile Leu Leu Ile Val Cys Met Thr Trp Arg Leu Ala
        335                 340                 345

ggg cct gga agt gaa aaa tac agt gat gac acc aaa tac acc gat ggc     1225
Gly Pro Gly Ser Glu Lys Tyr Ser Asp Asp Thr Lys Tyr Thr Asp Gly
    350                 355                 360

ctg cct gcg gct gac ctg atc ccc cca ccg ctg aag ccc agg aag gtc     1273
Leu Pro Ala Ala Asp Leu Ile Pro Pro Pro Leu Lys Pro Arg Lys Val
365                 370                 375                 380

tgg atc atc tac tca gcc gac cac ccc ctc tac gtg gac gtg gtc ctg     1321
Trp Ile Ile Tyr Ser Ala Asp His Pro Leu Tyr Val Asp Val Val Leu
                385                 390                 395

aaa ttc gcc cag ttc ctg ctc acc gcc tgc ggc acg gaa gtg gcc ctg     1369
Lys Phe Ala Gln Phe Leu Leu Thr Ala Cys Gly Thr Glu Val Ala Leu
            400                 405                 410

gac ctg ctg gaa gag cag gcc atc tcg gag gca gga gtc atg acc tgg     1417
Asp Leu Leu Glu Glu Gln Ala Ile Ser Glu Ala Gly Val Met Thr Trp
        415                 420                 425

gtg ggc cgt cag aag cag gag atg gtg gag agc aac tct aag atc atc     1465
Val Gly Arg Gln Lys Gln Glu Met Val Glu Ser Asn Ser Lys Ile Ile
    430                 435                 440

gtc ctg tgc tcc cgc ggc acg cgc gcc aag tgg cag gcg ctc ctg ggc     1513
Val Leu Cys Ser Arg Gly Thr Arg Ala Lys Trp Gln Ala Leu Leu Gly
445                 450                 455                 460

cgg ggg gcg cct gtg cgg ctg cgc tgc gac cac gga aag ccc gtg ggg     1561
Arg Gly Ala Pro Val Arg Leu Arg Cys Asp His Gly Lys Pro Val Gly
                465                 470                 475

gac ctg ttc act gca gcc atg aac atg atc ctc ccg gac ttc aag agg     1609
Asp Leu Phe Thr Ala Ala Met Asn Met Ile Leu Pro Asp Phe Lys Arg
            480                 485                 490

cca gcc tgc ttc ggc acc tac gta gtc tgc tac ttc agc gag gtc agc     1657
Pro Ala Cys Phe Gly Thr Tyr Val Val Cys Tyr Phe Ser Glu Val Ser
        495                 500                 505

tgt gac ggc gac gtc ccc gac ctg ttc ggc gcg gcg ccg cgg tac ccg     1705
Cys Asp Gly Asp Val Pro Asp Leu Phe Gly Ala Ala Pro Arg Tyr Pro
```

```
    510                 515                 520

ctc atg gac agg ttc gag gag gtg tac ttc cgc atc cag gac ctg gag      1753
Leu Met Asp Arg Phe Glu Glu Val Tyr Phe Arg Ile Gln Asp Leu Glu
525                 530                 535                 540

atg ttc cag ccg ggc cgc atg cac cgc gta ggg gag ctg tcg ggg gac      1801
Met Phe Gln Pro Gly Arg Met His Arg Val Gly Glu Leu Ser Gly Asp
                545                 550                 555

aac tac ctg cgg agc ccg ggc ggc agg cag ctc cgc gcc gcc ctg gac      1849
Asn Tyr Leu Arg Ser Pro Gly Gly Arg Gln Leu Arg Ala Ala Leu Asp
            560                 565                 570

agg ttc cgg gac tgg cag gtc cgc tgt ccc gac tgg ttc gaa tgt gag      1897
Arg Phe Arg Asp Trp Gln Val Arg Cys Pro Asp Trp Phe Glu Cys Glu
        575                 580                 585

aac ctc tac tca gca gat gac cag gat gcc ccg tcc ctg gac gaa gag      1945
Asn Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Gln Asp Ala Pro Ser Leu Asp Glu Glu
    590                 595                 600

gtg ttt gag gag cca ctg ctg cct ccg gga acc ggc atc gtg aag cgg      1993
Val Phe Glu Glu Pro Leu Leu Pro Pro Gly Thr Gly Ile Val Lys Arg
605                 610                 615                 620

gcg ccc ctg gtg cgc gag cct ggc tcc cag gcc tgc ctg gcc ata gac      2041
Ala Pro Leu Val Arg Glu Pro Gly Ser Gln Ala Cys Leu Ala Ile Asp
                625                 630                 635

ccg ctg gtc ggg gag gaa gga gga gca gca gtg gca aag ctg gaa cct      2089
Pro Leu Val Gly Glu Glu Gly Gly Ala Ala Val Ala Lys Leu Glu Pro
            640                 645                 650

cac ctg cag ccc cgg ggt cag cca gcg ccg cag ccc ctc cac acc ctg      2137
His Leu Gln Pro Arg Gly Gln Pro Ala Pro Gln Pro Leu His Thr Leu
        655                 660                 665

gtg ctc gcc gca gag gag ggg gcc ctg gtg gcc gcg gtg gag cct ggg      2185
Val Leu Ala Ala Glu Glu Gly Ala Leu Val Ala Ala Val Glu Pro Gly
    670                 675                 680

ccc ctg gct gac ggt gcc gca gtc cgg ctg gca ctg gcg ggg gag ggc      2233
Pro Leu Ala Asp Gly Ala Ala Val Arg Leu Ala Leu Ala Gly Glu Gly
685                 690                 695                 700

gag gcc tgc ccg ctg ctg ggc agc ccg ggc gct ggg cga aat agc gtc      2281
Glu Ala Cys Pro Leu Leu Gly Ser Pro Gly Ala Gly Arg Asn Ser Val
                705                 710                 715

ctc ttc ctc ccc gtg gac ccc gag gac tcg ccc ctt ggc agc agc acc      2329
Leu Phe Leu Pro Val Asp Pro Glu Asp Ser Pro Leu Gly Ser Ser Thr
            720                 725                 730

ccc atg gcg tct cct gac ctc ctt cca gag gac gtg agg gag cac ctc      2377
Pro Met Ala Ser Pro Asp Leu Leu Pro Glu Asp Val Arg Glu His Leu
        735                 740                 745

gaa ggc ttg atg ctc tcg ctc ttc gag cag agt ctg agc tgc cag gcc      2425
Glu Gly Leu Met Leu Ser Leu Phe Glu Gln Ser Leu Ser Cys Gln Ala
    750                 755                 760

cag ggg ggc tgc agt aga ccc gcc atg gtc ctc aca gac cca cac acg      2473
Gln Gly Gly Cys Ser Arg Pro Ala Met Val Leu Thr Asp Pro His Thr
765                 770                 775                 780

ccc tac gag gag gag cag cgg cag tca gtg cag tct gac cag ggc tac      2521
```

```
ggctggaagc cggaagcgag caaagtggag ccgactcgaa ctccaccggc acgagggcgg      60

aaaagaaagc ctcagaacgt tcgctcgctg cgtccccagc cggggccgag ccctccgcga     120

cgccacccgg gcc atg ggg gcc gca cgc agc ccg ccg tcc gct gtc ccg         169
              Met Gly Ala Ala Arg Ser Pro Pro Ser Ala Val Pro
              1               5                  10

ggg ccc ctg ctg ggg ctg ctc ctg ctg ctc ctg ggc gtg ctg gcc ccg       217
Gly Pro Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ala Pro
        15                  20                  25

ggt ggc gcc tcc ctg cga ctc ctg gac cac cgg gcg ctg gtc tgc tcc       265
Gly Gly Ala Ser Leu Arg Leu Leu Asp His Arg Ala Leu Val Cys Ser
    30                  35                  40

cag ccg ggg cta aac tgc acg gtc aag aat agt acc tgc ctg gat gac       313
Gln Pro Gly Leu Asn Cys Thr Val Lys Asn Ser Thr Cys Leu Asp Asp
45                  50                  55                  60

agc tgg att cac cct cga aac ctg acc ccc tcc tcc cca aag gac ctg       361
Ser Trp Ile His Pro Arg Asn Leu Thr Pro Ser Ser Pro Lys Asp Leu
                65                  70                  75

cag atc cag ctg cac ttt gcc cac acc caa caa gga gac ctg ttc ccc       409
Gln Ile Gln Leu His Phe Ala His Thr Gln Gln Gly Asp Leu Phe Pro
            80                  85                  90

gtg gct cac atc gaa tgg aca ctg cag aca gac gcc agc atc ctg tac       457
Val Ala His Ile Glu Trp Thr Leu Gln Thr Asp Ala Ser Ile Leu Tyr
        95                  100                 105

ctc gag ggt gca gag tta tct gtc ctg cag ctg aac acc aat gaa cgt       505
Leu Glu Gly Ala Glu Leu Ser Val Leu Gln Leu Asn Thr Asn Glu Arg
    110                 115                 120

ttg tgc gtc agg ttt gag ttt ctg tcc aaa ctg agg cat cac cac agg       553
Leu Cys Val Arg Phe Glu Phe Leu Ser Lys Leu Arg His His His Arg
125                 130                 135                 140

cgg tgg cgt ttt acc ttc agc cac ttt gtg gtt gac cct gac cag gaa       601
Arg Trp Arg Phe Thr Phe Ser His Phe Val Val Asp Pro Asp Gln Glu
                145                 150                 155

tat gag gtg acc gtt cac cac ctg ccc aag ccc atc cct gat ggg gac       649
Tyr Glu Val Thr Val His His Leu Pro Lys Pro Ile Pro Asp Gly Asp
            160                 165                 170

cca aac cac cag tcc aag aat ttc ctt gtg cct gac tgt gag cac gcc       697
Pro Asn His Gln Ser Lys Asn Phe Leu Val Pro Asp Cys Glu His Ala
        175                 180                 185

agg atg aag gta acc acg cca tgc atg agc tca ggc agc ctg tgg gac       745
Arg Met Lys Val Thr Thr Pro Cys Met Ser Ser Gly Ser Leu Trp Asp
    190                 195                 200

ccc aac atc acc gtg gag acc ctg gag gcc cac cag ctg cgt gtg agc       793
Pro Asn Ile Thr Val Glu Thr Leu Glu Ala His Gln Leu Arg Val Ser
205                 210                 215                 220

ttc acc ctg tgg aac gaa tct acc cat tac cag atc ctg ctg acc agt       841
Phe Thr Leu Trp Asn Glu Ser Thr His Tyr Gln Ile Leu Leu Thr Ser
                225                 230                 235

ttt ccg cac atg gag aac cac agt tgc ttt gag cac atg cac cac ata       889
Phe Pro His Met Glu Asn His Ser Cys Phe Glu His Met His His Ile
            240                 245                 250
```

Pro Arg Asn Leu Thr Pro Ser Ser Pro Lys Asp Leu Gln Ile Gln Leu
65 70 75 80

His Phe Ala His Thr Gln Gln Gly Asp Leu Phe Pro Val Ala His Ile
85 90 95

Glu Trp Thr Leu Gln Thr Asp Ala Ser Ile Leu Tyr Leu Glu Gly Ala
100 105 110

Glu Leu Ser Val Leu Gln Leu Asn Thr Asn Glu Arg Leu Cys Val Arg
115 120 125

Phe Glu Phe Leu Ser Lys Leu Arg His His His Arg Arg Trp Arg Phe
130 135 140

Thr Phe Ser His Phe Val Val Asp Pro Asp Gln Glu Tyr Glu Val Thr
145 150 155 160

Val His His Leu Pro Lys Pro Ile Pro Asp Gly Asp Pro Asn His Gln
165 170 175

Ser Lys Asn Phe Leu Val Pro Asp Cys Glu His Ala Arg Met Lys Val
180 185 190

Thr Thr Pro Cys Met Ser Ser Gly Ser Leu Trp Asp Pro Asn Ile Thr
195 200 205

Val Glu Thr Leu Glu Ala His Gln Leu Arg Val Ser Phe Thr Leu Trp
210 215 220

Asn Glu Ser Thr His Tyr Gln Ile Leu Leu Thr Ser Phe Pro His Met
225 230 235 240

Glu Asn His Ser Cys Phe Glu His Met His His Ile Pro Ala Pro Arg
245 250 255

Pro Glu Glu Phe His Gln Arg Ser Asn Val Thr Leu Thr Leu Arg Asn
260 265 270

Leu Lys Gly Cys Cys Arg His Gln Val Gln Ile Gln Pro Phe Phe Ser
275 280 285

Ser Cys Leu Asn Asp Cys Leu Arg His Ser Ala Thr Val Ser Cys Pro
290 295 300

Glu Met Pro Asp Thr Pro Glu Pro Ile Pro Asp Tyr Met Pro Leu Trp
305 310 315 320

Val Tyr Trp Phe Ile Thr Gly Ile Ser Ile Leu Leu Val Gly Ser Val

325 330 335

Ile Leu Leu Ile Val Cys Met Thr Trp Arg Leu Ala Gly Pro Gly Ser
340 345 350

Glu Lys Tyr Ser Asp Asp Thr Lys Tyr Thr Asp Gly Leu Pro Ala Ala
355 360 365

Asp Leu Ile Pro Pro Pro Leu Lys Pro Arg Lys Val Trp Ile Ile Tyr
370 375 380

Ser Ala Asp His Pro Leu Tyr Val Asp Val Val Leu Lys Phe Ala Gln
385 390 395 400

Phe Leu Leu Thr Ala Cys Gly Thr Glu Val Ala Leu Asp Leu Leu Glu
405 410 415

Glu Gln Ala Ile Ser Glu Ala Gly Val Met Thr Trp Val Gly Arg Gln
420 425 430

Lys Gln Glu Met Val Glu Ser Asn Ser Lys Ile Ile Val Leu Cys Ser
435 440 445

Arg Gly Thr Arg Ala Lys Trp Gln Ala Leu Leu Gly Arg Gly Ala Pro
450 455 460

Val Arg Leu Arg Cys Asp His Gly Lys Pro Val Gly Asp Leu Phe Thr
465 470 475 480

Ala Ala Met Asn Met Ile Leu Pro Asp Phe Lys Arg Pro Ala Cys Phe
485 490 495

Gly Thr Tyr Val Val Cys Tyr Phe Ser Glu Val Ser Cys Asp Gly Asp
500 505 510

Val Pro Asp Leu Phe Gly Ala Ala Pro Arg Tyr Pro Leu Met Asp Arg
515 520 525

Phe Glu Glu Val Tyr Phe Arg Ile Gln Asp Leu Glu Met Phe Gln Pro
530 535 540

Gly Arg Met His Arg Val Gly Glu Leu Ser Gly Asp Asn Tyr Leu Arg
545 550 555 560

Ser Pro Gly Gly Arg Gln Leu Arg Ala Ala Leu Asp Arg Phe Arg Asp
565 570 575

Trp Gln Val Arg Cys Pro Asp Trp Phe Glu Cys Glu Asn Leu Tyr Ser
580 585 590

Ala Asp Asp Gln Asp Ala Pro Ser Leu Asp Glu Glu Val Phe Glu Glu
595 600 605

Pro Leu Leu Pro Pro Gly Thr Gly Ile Val Lys Arg Ala Pro Leu Val
610 615 620

Arg Glu Pro Gly Ser Gln Ala Cys Leu Ala Ile Asp Pro Leu Val Gly
625 630 635 640

Glu Glu Gly Gly Ala Ala Val Ala Lys Leu Glu Pro His Leu Gln Pro
645 650 655

Arg Gly Gln Pro Ala Pro Gln Pro Leu His Thr Leu Val Leu Ala Ala
660 665 670

Glu Glu Gly Ala Leu Val Ala Ala Val Glu Pro Gly Pro Leu Ala Asp
675 680 685

Gly Ala Ala Val Arg Leu Ala Leu Ala Gly Glu Gly Glu Ala Cys Pro
690 695 700

Leu Leu Gly Ser Pro Gly Ala Gly Arg Asn Ser Val Leu Phe Leu Pro
705 710 715 720

Val Asp Pro Glu Asp Ser Pro Leu Gly Ser Ser Thr Pro Met Ala Ser
725 730 735

Pro Asp Leu Leu Pro Glu Asp Val Arg Glu His Leu Glu Gly Leu Met
740 745 750

Leu Ser Leu Phe Glu Gln Ser Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Gly Cys
755 760 765

Ser Arg Pro Ala Met Val Leu Thr Asp Pro His Thr Pro Tyr Glu Glu
770 775 780

Glu Gln Arg Gln Ser Val Gln Ser Asp Gln Gly Tyr Ile Ser Arg Ser
785 790 795 800

Ser Pro Gln Pro Pro Glu Gly Leu Thr Glu Met Glu Glu Glu Glu Glu
805 810 815

Glu Glu Gln Asp Pro Gly Lys Pro Ala Leu Pro Leu Ser Pro Glu Asp
820 825 830

Leu Glu Ser Leu Arg Ser Leu Gln Arg Gln Leu Leu Phe Arg Gln Leu
835 840 845

Gln Lys Asn Ser Gly Trp Asp Thr Met Gly Ser Glu Ser Glu Gly Pro
850 855 860

Ser Ala
865

<210> 5
<211> 21
<212> PRT
<213> Apis mellifera

<400> 5

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
1 5 10 15

Ser Tyr Ile Tyr Ala
20

REIVINDICAÇÕES

1. Método de diagnóstico de um distúrbio relacionado com IL-17F em um indivíduo, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

detectar uma quantidade de teste de um produto de gene de IL-17F em uma amostra do indivíduo; e

comparar a quantidade de teste com uma quantidade normal do produto de gene de IL-17F em uma amostra de controle,

por meio do qual uma quantidade de teste significativamente acima da quantidade normal proporciona uma indicação positiva no diagnóstico de uma doença relacionada com IL-17F.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o distúrbio relacionado com IL-17F é inflamação das vias aéreas.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um paciente diagnosticado com fibrose cística.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o indivíduo está sofrendo de uma exacerbação pulmonar.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a exacerbação pulmonar é devido a um agente infeccioso.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o produto de gene de IL-17F é uma proteína IL-17F.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a proteína IL-17F é detectada com um anticorpo anti-IL-17F.

8. Método de seleção de compostos capazes de inibirem a ligação de IL-17F em IL-17R, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

contatar uma amostra contendo IL-17F e IL-17R com um composto; e

determinar se a ligação de IL-17F em IL-17R na amostra contatada com o composto de teste é diminuída em relação à ligação de IL-

17F em IL-17R em uma amostra não contatada com o composto,

por meio do qual uma diminuição na ligação de IL-17F em IL-17R na amostra contatada com o composto identifica o composto como aquele que inibe a ligação de IL-17F em IL-17R.

9. Uso de um antagonista de IL-17F, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento para tratar um indivíduo sob risco de, ou diagnosticado com, um distúrbio relacionado com IL-17F.

10. Uso de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o distúrbio relacionado com IL-17F é inflamação das vias aéreas.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um paciente diagnosticado com fibrose cística.

12. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o indivíduo está sofrendo de exacerbação pulmonar.

13. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a exacerbação pulmonar é devido a um agente infeccioso.

14. Uso de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o antagonista de IL-17F é selecionado do grupo consistindo de um anticorpo anti-IL-17F inibitório, um anticorpo anti-IL-17R inibitório, IL-17R solúvel, uma proteína de fusão contendo IL-17R, uma proteína de fusão contendo um fragmento ligante em IL-17F de IL-17R, uma molécula pequena antagonística, uma molécula de ácido nucleico de IL-17F anti-sentido, uma molécula de ácido nucleico de IL-17R anti-sentido, uma molécula de ácido nucleico de siRNA IL-17F, e uma molécula de ácido nucleico de siRNA IL-17R.

15. Uso de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente efetiva de pelo menos um agente terapêutico adicional.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um agente terapêutico adicional é selecionado

do grupo consistindo de inibidores de citocina, inibidores de fator de crescimento, imunossupressores, agentes antiinflamatórios, inibidores metabólicos, inibidores de enzima, agentes citotóxicos, e agentes citostáticos.

17. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o pelo menos um agente terapêutico adicional é selecionado do grupo consistindo de antagonistas de TNF, agentes anti-TNF, antagonistas de IL-12, antagonistas de IL-15, antagonistas de IL-17, antagonistas de IL-18, antagonistas de IL-22, agentes depletantes de célula T, agentes depletantes de célula B, ciclosporina, FK-506, CCI-779, etanercepte, infliximabe, rituximabe, adalimumabe, prednisolona, azatioprina, ouro, sulfasalazina, cloroquina, hidróxi-cloroquina, minociclina, anaquinra, abatacepte, metotrexato, leflunomida, rapamicina, análogos de rapamicinas, inibidores de Cox-2, inibidores de cPLA2, NSAIDs, inibidores de p38, antagonistas de B7.1, B7.2, ICOSL, ICOS e/ou CD28, e agonistas de CTLA4.

18. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender um antagonista de IL-17F e um carreador farmaceuticamente aceitável.

19. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que o antagonista de IL-17F é selecionado do grupo consistindo de um anticorpo anti-IL-17F inibitório, um anticorpo anti-IL-17R inibitório, IL-17R solúvel, uma proteína de fusão contendo IL-17R, uma proteína de fusão contendo um fragmento ligante em IL-17F de IL-17R, uma molécula pequena antagonística, uma molécula de ácido nucleico de IL-17F anti-sentido, uma molécula de ácido nucleico de IL-17R anti-sentido, uma molécula de ácido nucleico de siRNA IL-17F, e uma molécula de ácido nucleico de siRNA IL-17R.

20. Adjuvante de vacina, caracterizado pelo fato de compreender um antagonista de IL-17F e um antígeno bacteriano.

21. Adjuvante de vacina de acordo com a reivindicação 20,

caracterizado pelo fato de que o antagonista de IL-17F é selecionado do grupo consistindo de um anticorpo anti-IL-17F inibitório, um anticorpo anti-IL-17R inibitório, IL-17R solúvel, uma proteína de fusão contendo IL-17R, uma proteína de fusão contendo um fragmento ligante em IL-17F de IL-17R, uma molécula pequena antagonística, uma molécula de ácido nucleico de IL-17F anti-sentido, uma molécula de ácido nucleico de IL-17R anti-sentido, uma molécula de ácido nucleico de siRNA IL-17F, e uma molécula de ácido nucleico de siRNA IL-17R.

Figura 1

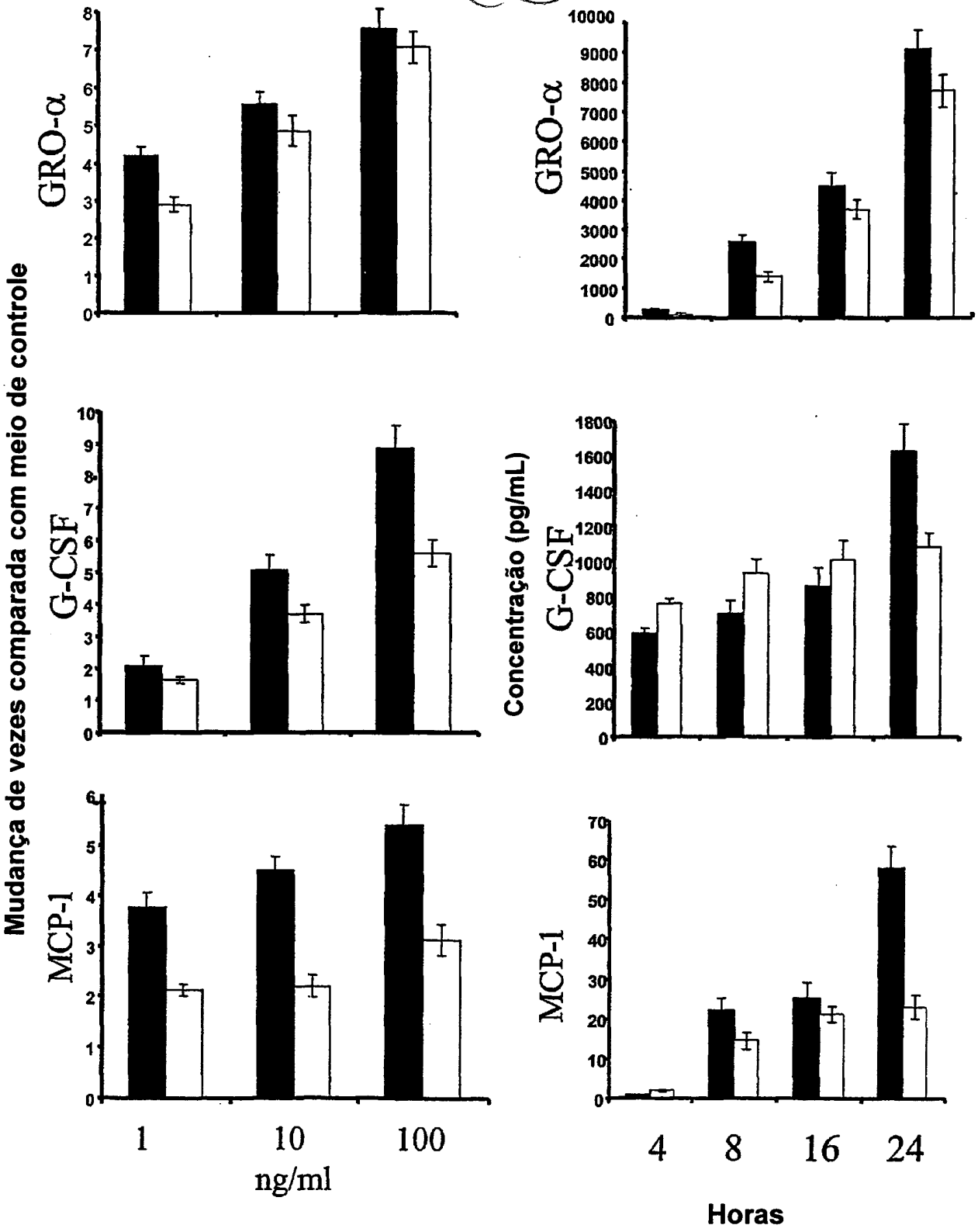

Mudança de vezes comparada com meio de controle
GRO-α
GRO-α
G-CSF
G-CSF
Concentração (pg/mL)
MCP-1
MCP-1
1
10
100
ng/ml
4
8
16
24
Horas

Figura 2

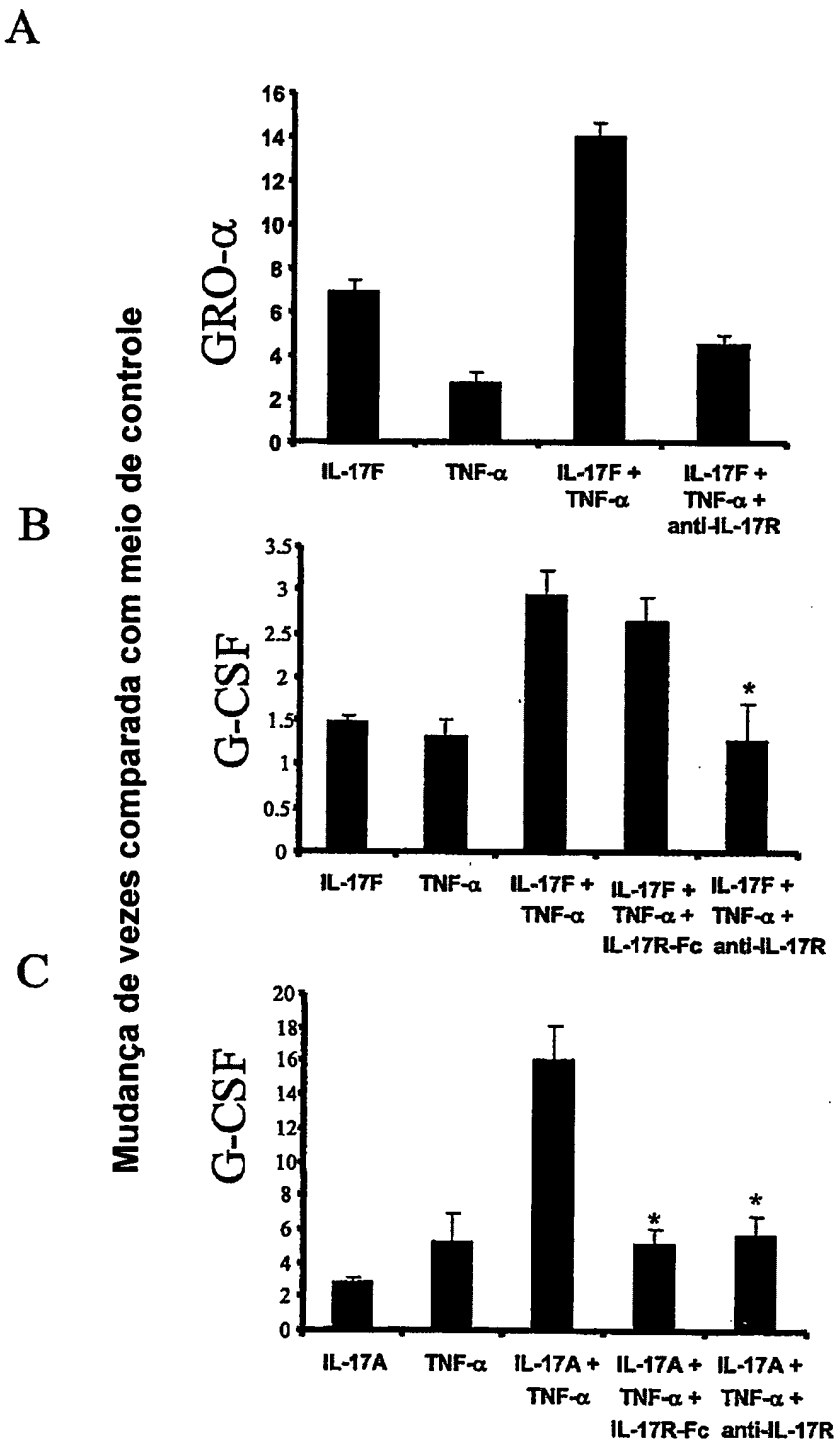

A
B
C
Mudança de vezes comparada com meio de controle
GRO-α
16
14
12
10
8
6
4
2
0
IL-17F
TNF-α
IL-17F + TNF-α
IL-17F + TNF-α + anti-IL-17R
G-CSF
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
IL-17F
TNF-α
IL-17F + TNF-α
IL-17F + TNF-α + IL-17R-Fc
IL-17F + TNF-α + anti-IL-17R
*
G-CSF
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
IL-17A
TNF-α
IL-17A + TNF-α
IL-17A + TNF-α + IL-17R-Fc
IL-17A + TNF-α + anti-IL-17R
*
*

Figura 3

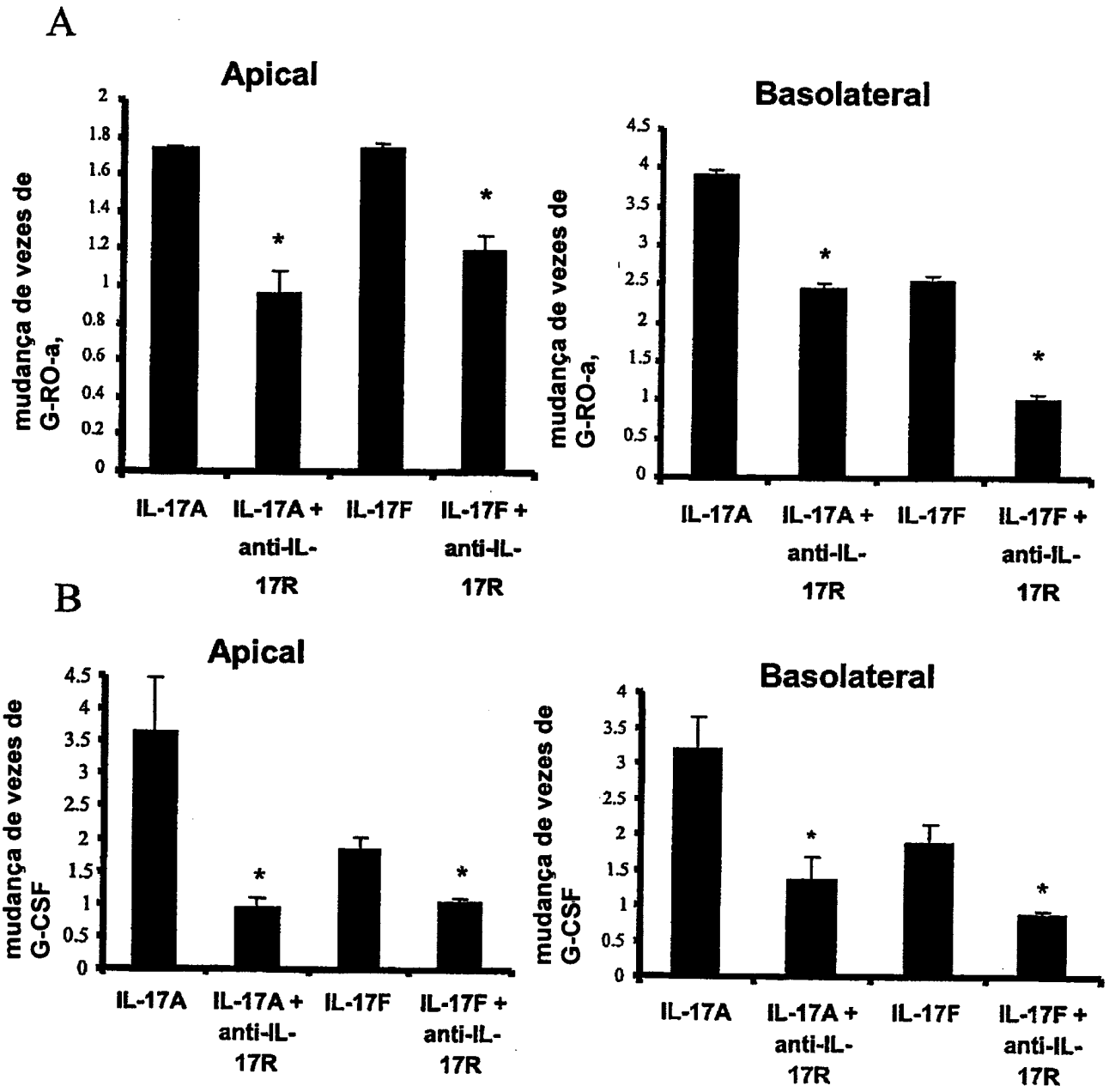
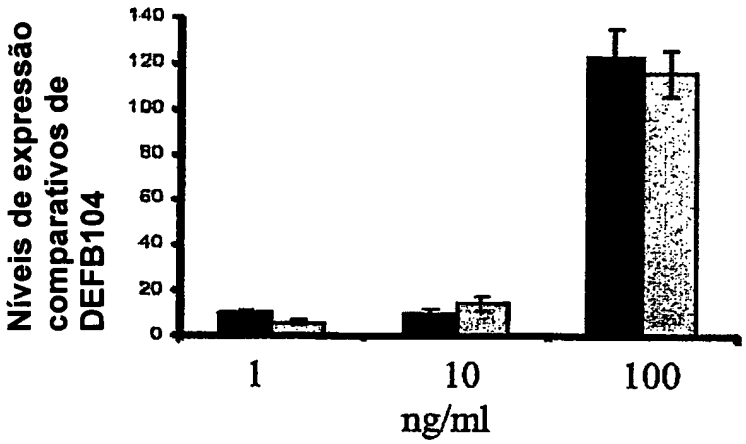
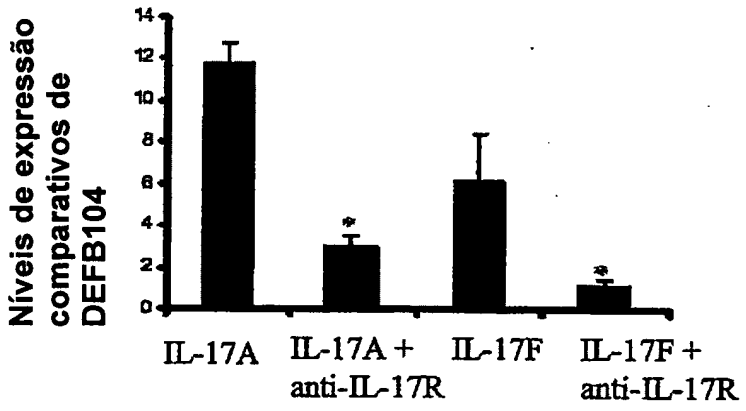

A
Apical
mudança de vezes de G-RO-a,
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
*
IL-17A
IL-17A + anti-IL-17R
IL-17F
IL-17F + anti-IL-17R
Basolateral
mudança de vezes de G-RO-a,
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
IL-17A
IL-17A + anti-IL-17R
IL-17F
IL-17F + anti-IL-17R
B
Apical
mudança de vezes de G-CSF
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
IL-17A
IL-17A + anti-IL-17R
IL-17F
IL-17F + anti-IL-17R
Basolateral
mudança de vezes de G-CSF
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
IL-17A
IL-17A + anti-IL-17R
IL-17F
IL-17F + anti-IL-17R

Figura 4

A


Níveis de expressão comparativos de DEFB104
140
120
100
80
60
40
20
0
1
10
100
ng/ml

B


Níveis de expressão comparativos de DEFB104
14
12
10
8
6
4
2
0
*
*
IL-17A
IL-17A + anti-IL-17R
IL-17F
IL-17F + anti-IL-17R

C

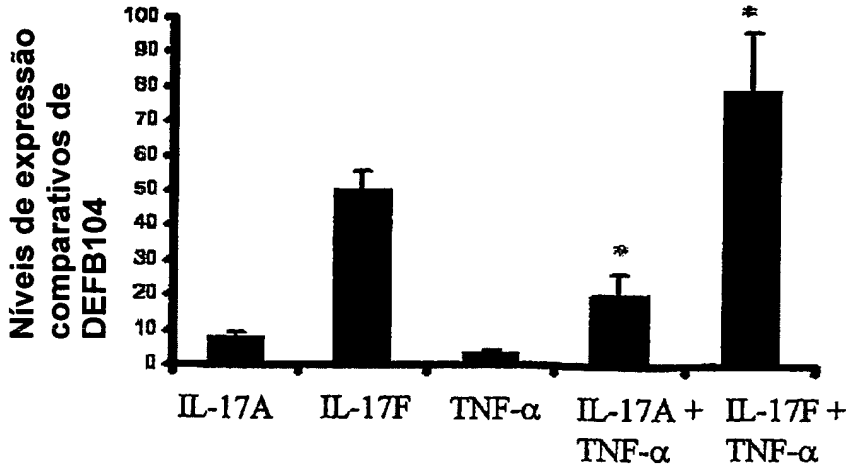

Níveis de expressão comparativos de DEFB104
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
*
IL-17A
IL-17F
TNF-α
IL-17A + TNF-α
IL-17F + TNF-α

Figura 5

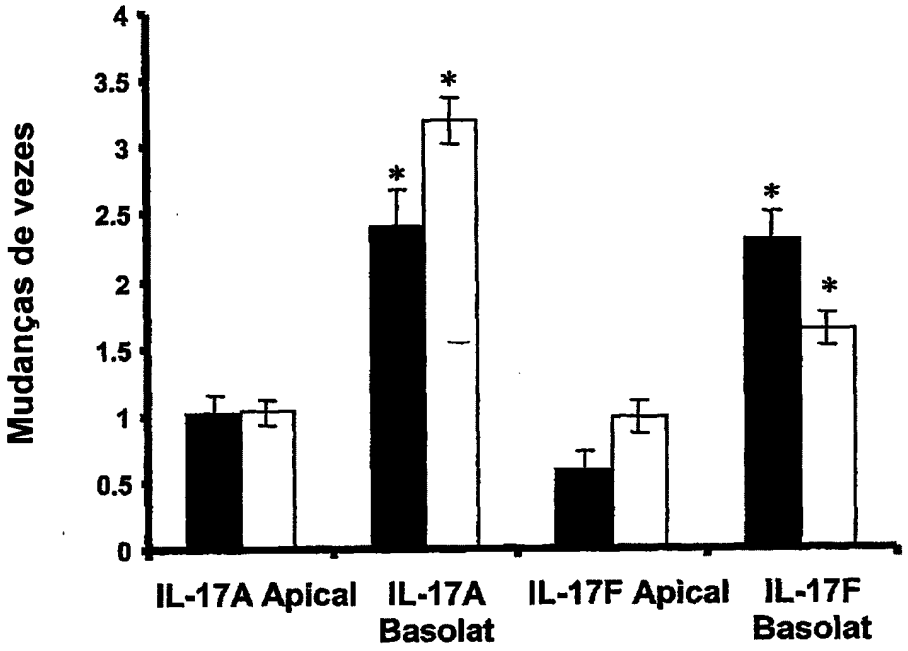

Mudanças de vezes
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
*
*
IL-17A Apical
IL-17A Basolat
IL-17F Apical
IL-17F Basolat

Figura 6

A

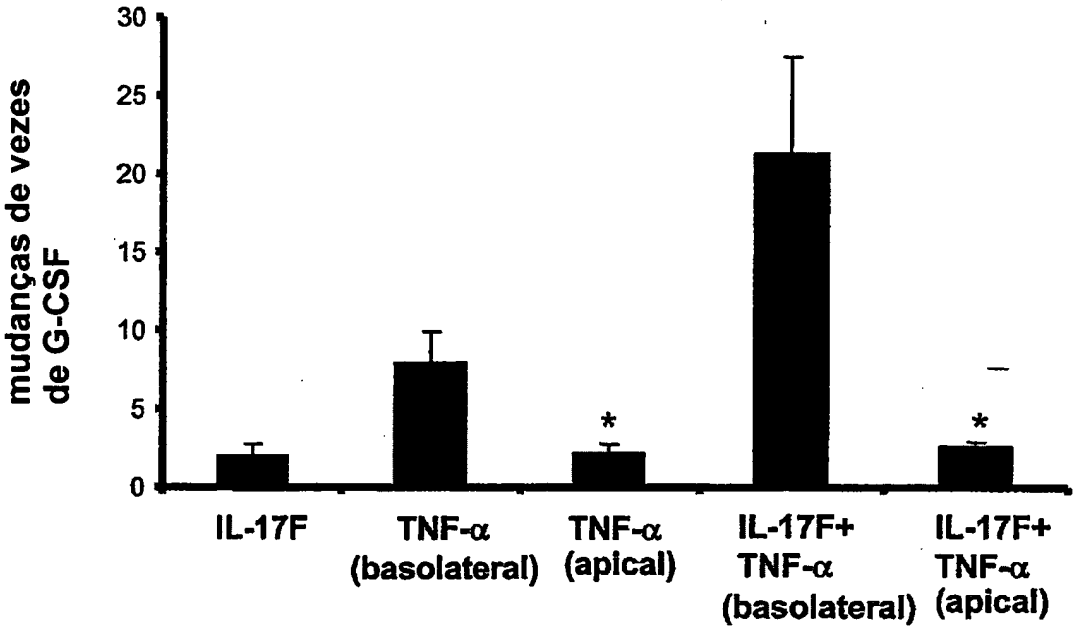
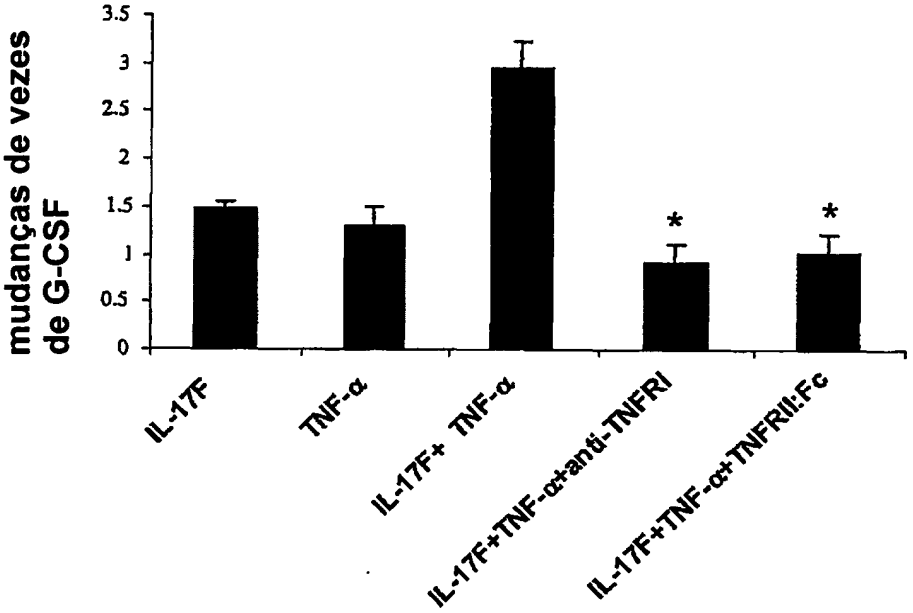

mudanças de vezes de G-CSF
30
25
20
15
10
5
0
*
*
IL-17F
TNF-α (basolateral)
TNF-α (apical)
IL-17F+ TNF-α (basolateral)
IL-17F+ TNF-α (apical)

Figura 6

B


mudanças de vezes de G-CSF
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
*
IL-17F
TNF-α
IL-17F+ TNF-α
IL-17F+TNF-α+anti-TNFRI
IL-17F+TNF-α+TNFRII:Fc

C

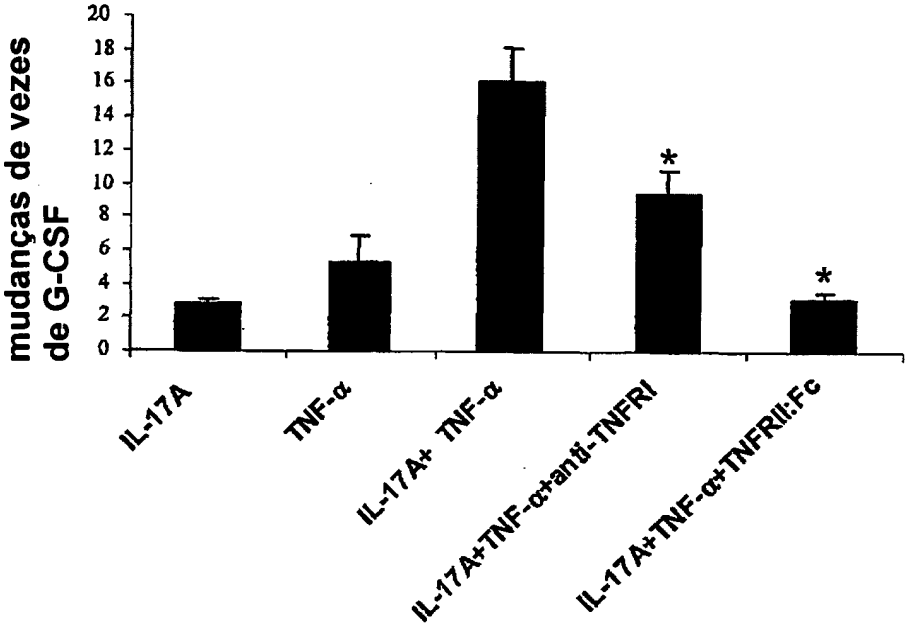

mudanças de vezes de G-CSF
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
*
*
IL-17A
TNF-α
IL-17A+ TNF-α
IL-17A+TNF-α+anti-TNFRI
IL-17A+TNF-α+TNFRII:Fc

Figura 7A

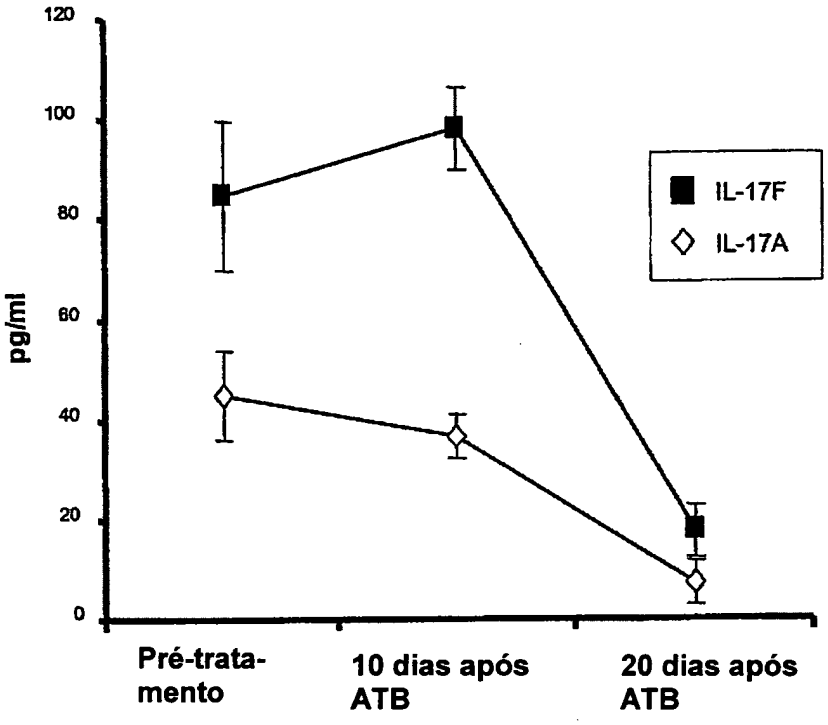
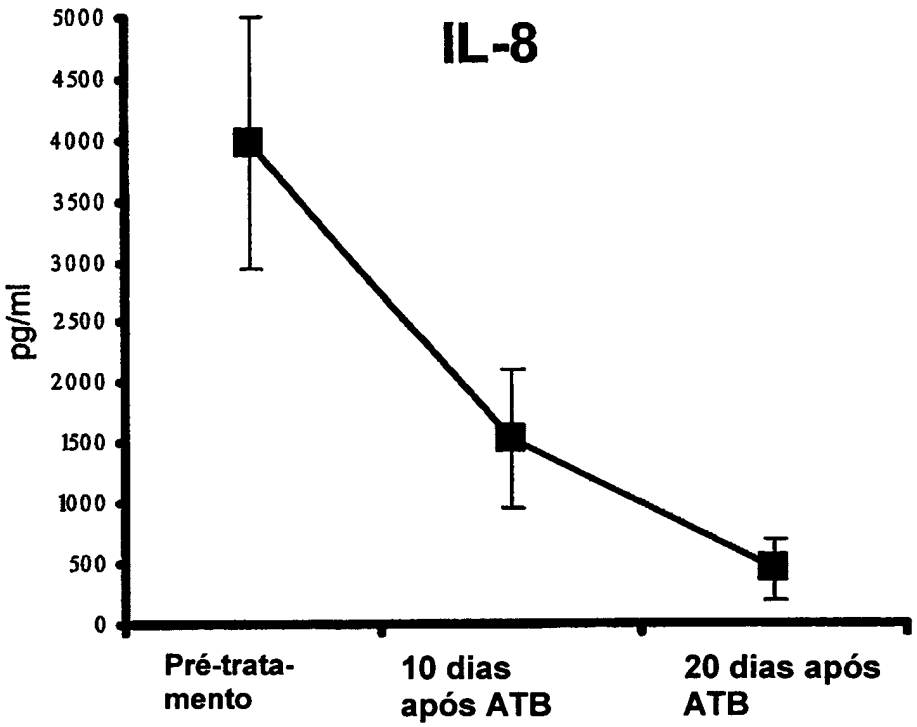
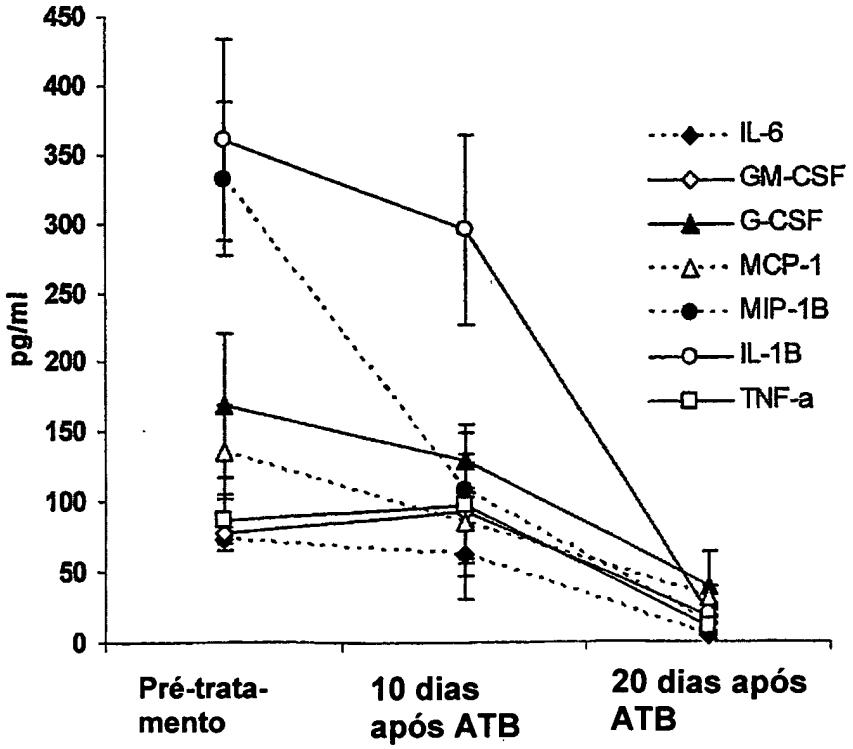

120
100
80
60
40
20
0
pg/ml
IL-17F
IL-17A
Pré-trata-mento
10 dias após ATB
20 dias após ATB

Figura 7B


IL-8
pg/ml
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Pré-trata-mento
10 dias após ATB
20 dias após ATB


pg/ml
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
IL-6
GM-CSF
G-CSF
MCP-1
MIP-1B
IL-1B
TNF-a
Pré-trata-mento
10 dias após ATB
20 dias após ATB

PI0608210-6

RESUMO

"MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE UM DISTÚRBIO RELACIONADO COM IL-17F EM UM INDIVÍDUO E DE SELEÇÃO DE COMPOSTOS CAPAZES DE INIBIREM A LIGAÇÃO DE IL-17F EM IL-17R, USO DE UM ANTAGONISTA DE IL-17F, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E, ADJUVANTE DE VACINA"

A invenção refere-se às descobertas de que inflamação das vias aéreas mediada por IL-17F pode ser mediada via sinalização por intermédio de IL-17R sobre a superfície basolateral de células epiteliais respiratórias de humano. Assim, a presente invenção proporciona polipeptídeos e polinucleotídeos IL-17F ou IL-17R isolados e purificados. A presente invenção também é direcionada aos métodos novos para selecionar compostos de teste capazes de inibirem, i.e., diminuírem, limitarem, bloquearem, ou diferentemente reduzirem a atividade de IL-17F, e aos métodos para diagnosficar, prognosticar, e monitorar o progresso de distúrbios relacionados com a bioatividade de IL-17F, e.g., distúrbios relacionados com os efeitos de ligação de IL-17F em IL-17R em inflamação das vias aéreas, e.g., em pacientes com fibrose cística, incluindo exacerbações pulmonares devido às infecções bacterianas nos mesmos. A presente invenção é adicionalmente direcionada aos novos agentes terapêuticos e alvos terapêuticos e aos métodos para a intervenção (tratamento) e a prevenção de citados distúrbios relacionados com a bioatividade de IL-17F.