

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 414**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2004 E 14163686 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **04.10.2023 EP 2784084**

54 Título: **Anticuerpos antagonistas a polipéptidos heterólogos IL-17 A/F**

30 Prioridad:

08.07.2003 US 485599 P

11.07.2003 US 486457 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
23.04.2024

73 Titular/es:

NOVARTIS PHARMA AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

ARNOTT, DAVID;

GURNEY, AUSTIN;

HASS, PHILLIP;

LEE, JAMES y

WU, YAN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

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

ES 2 751 414 T5

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos antagonistas a polipéptidos heterólogos IL-17 A/F

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere en general anticuerpos antagonistas contra una nueva citoquina humana designada aquí como interleuquina-17A/F (IL-17A/F).

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Las proteínas extracelulares juegan un papel importante en, entre otras cosas, la formación, la diferenciación y el mantenimiento de los organismos multicelulares. El destino de muchas células individuales, por ejemplo, la proliferación, migración, diferenciación, o la interacción con otras células, normalmente se rigen por la información recibida de otras células y/o el entorno inmediato. Esta información se suele transmitir por polipéptidos secretados (por ejemplo, factores mitogénicos, factores de supervivencia, factores citotóxicos, factores de diferenciación, neuropéptidos y hormonas) que es, a su vez, recibida e interpretada por diversos receptores de las células o proteínas de membrana. Estos polipéptidos secretados o moléculas de señalización normalmente pasan por la vía de secreción celular para llegar a su sitio de acción en el medio extracelular.

[0003] Las proteínas secretadas tienen diversas aplicaciones industriales, incluyendo los productos farmacéuticos, de diagnóstico, biosensores y biorreactores. La mayoría de los fármacos de proteínas disponibles en la actualidad, tales como agentes trombolíticos, interferones, interleuquinas, eritropoyetina, factores estimulantes de colonias, y otras varias citoquinas, son proteínas secretoras. Sus receptores, que son proteínas de membrana, también tienen potencial como agentes terapéuticos o de diagnóstico.

[0004] Las proteínas unidas a la membrana y receptores pueden desempeñar un papel importante en, entre otras cosas, la formación, la diferenciación y el mantenimiento de los organismos multicelulares. El destino de muchas células individuales, por ejemplo, proliferación, migración, diferenciación, o interacción con otras células, normalmente se rigen por la información recibida de otras células y/o el entorno inmediato. Esta información se suele transmitir por polipéptidos secretados (por ejemplo, factores mitogénica, factores de supervivencia, factores citotóxicos, factores de diferenciación, neuropéptidos y hormonas) que es, a su vez, recibida e interpretada por diversos receptores de las células o proteínas de membrana. Dichas proteínas unidas a la membrana y receptores de la célula incluyen, pero no están limitados a, los receptores de las citoquinas, receptores quinasas, fosfatasa de los receptores, los receptores implicados en las interacciones célula-célula, y las moléculas de adhesina celular como selectinas e integrinas. Por ejemplo, la transducción de señales que regulan el crecimiento y la diferenciación celular está regulada en parte por la fosforilación de varias proteínas celulares. Quinasas tirosina de proteínas, enzimas que catalizan este proceso, también puede actuar como receptores del factor de crecimiento. Los ejemplos incluyen los receptores de factor de crecimiento de fibroblastos y factor de crecimiento del nervio receptor de factor.

[0005] De manera similar a las proteínas secretadas, las proteínas unidas a la membrana y las moléculas de los receptores tienen diversas aplicaciones industriales, incluso como agentes farmacéuticos y de diagnóstico. Inmuno adhesinas receptoras, por ejemplo, pueden ser empleadas como agentes terapéuticos para bloquear las interacciones receptor-ligando. Las proteínas unidas a la membrana también pueden ser empleadas para la detección de péptido o inhibidores de molécula pequeña potenciales de la interacción receptor/ligando relevante.

[0006] Se están realizando esfuerzos tanto por la industria y el mundo académico para identificar nuevas proteínas secretadas nativas y el receptor nativo o proteínas unidas a la membrana. Muchos esfuerzos se centran en la selección de las librerías de ADN recombinante de mamíferos para identificar las secuencias que codifican las nuevas proteínas secretadas. Ejemplos de procedimientos y técnicas están descritos en la literatura [ver, por ejemplo, Klein et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93:7108-7113 (1996); Patente de Estados Unidos No. 5.536.637].

[0007] En este sentido, la presente invención se refiere a la identificación de nuevos polipéptidos secretados de la familia de la interleuquina-17 (IL-17) que han demostrado estar relacionados con las enfermedades mediadas por el sistema inmunitario e inflamatorias. Las enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario e inflamatorias son la manifestación o consecuencia de mecanismos biológicos interconectados bastante complejos, a menudo múltiples, que en la fisiología normal son críticos para responder al ataque o lesión, iniciar la reparación del ataque o lesión, y montar la defensa innata y adquirida frente a los organismos extraños. La enfermedad o patología se produce cuando estos mecanismos fisiológicos normales causan un ataque o lesión adicional ya sea directamente relacionado con la intensidad de la respuesta, como consecuencia de la regulación anormal o excesiva estimulación, como reacción a la misma, o como una combinación de éstas.

[0008] Aunque la génesis de estas enfermedades a menudo involucra vías de varias etapas y a menudo caminos múltiples sistemas y vías biológicos diferentes, la intervención en los puntos críticos en una o más de estas vías puede tener un efecto paliativo o terapéutico. La intervención terapéutica puede ocurrir ya sea por antagonismo de un

proceso/vía de detrimento o la estimulación de un proceso/vía beneficioso.

[0009] Muchas enfermedades autoinmunes relacionadas son conocidas y han sido ampliamente estudiados. Esas enfermedades incluyen son las enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmunitario (como la artritis reumatoide, enfermedad renal mediada por el sistema inmunitario, enfermedades hepato biliares, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), psoriasis y asma), enfermedades inflamatorias no mediadas por el sistema inmunitario, enfermedades infecciosas, enfermedades de inmunodeficiencia, la neoplasia, etc.

[0010] Los linfocitos T (células T) son un componente importante de una respuesta inmunitaria de los mamíferos. Las células T reconocen los antígenos que están asociados con una auto-molécula codificada por los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). El antígeno se puede mostrar junto con las moléculas de MHC en la superficie de células que presentan antígenos, células infectadas por virus, células cancerosas, injertos, etc. El sistema de células T elimina estas células alteradas que representan una amenaza para la salud del mamífero huésped. Las células T incluyen linfocitos colaboradores T y células T citotóxicas. Las células T colaboradoras proliferan de manera extensiva a raíz del reconocimiento de un complejo antígeno-MHC en la presentación de un antígeno de la célula. Las células T colaboradoras también secretan una gran variedad de citoquinas, es decir, linfocinas, que desempeñan un papel central en la activación de células B, células T citotóxicas y una variedad de otras células que participan en la respuesta inmunitaria.

[0011] Un suceso central, tanto en las respuestas inmunes humoral y mediada por células es la activación y expansión clonal de las células T colaboradoras. La activación de células T colaboradoras se inicia por la interacción del receptor de células T (TCR) - complejo CD3 con un antígeno-MHC en la superficie de una célula que presente un antígeno. Esta interacción media en una cascada de eventos bioquímicos que inducen al descanso de células T auxiliares para entrar en un ciclo celular (el G0 a la transición G1) y resulta en la expresión de un receptor de alta afinidad para IL-2 y algunas veces IL-4. La célula T activada avanza a través del ciclo proliferando y diferenciándose en las células de memoria o células efectoras.

[0012] Además de las señales mediadas por el TCR, la activación de células T implica coestimulación adicional inducida por citoquinas liberadas por las células que presentan antígenos o por medio de interacciones con las moléculas unidas a la membrana de la célula que presenta el antígeno y la célula T. Las citoquinas IL-1 e IL-6 se ha demostrado que proporcionan una señal de coestimuladora. Además, la interacción entre la molécula B7 expresada en la superficie de células presentadoras de un antígeno y moléculas CD28 y CTLA-4 expresadas en la superficie de las células T efectúan la activación de células T. Las células T activadas expresan un mayor número de moléculas de adhesión celular, como el ICAM-1, integrinas, VLA-4, LFA-1, CD56, etc.

[0013] La proliferación de células T en un cultivo mixto de linfocitos o de reacción mixta de linfocitos (MLR) es una indicación establecida de la capacidad de un compuesto para estimular el sistema inmunitario. En muchas respuestas inmunes, células inflamatorias se infiltran en el sitio de la lesión o infección. Las células migratorias pueden ser neutrófilos, eosinófilos, monocitos o linfocitos, como puede ser determinado por el examen histológico de los tejidos afectados. Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

[0014] Las enfermedades inmunes relacionadas podrían ser tratadas suprimiendo la respuesta inmunitaria. Utilizando anticuerpos neutralizantes que inhiben las moléculas que tengan actividad inmunitaria estimulante serían beneficiosos en el tratamiento de enfermedades inmunes e inflamatorias. Las moléculas que inhiben la respuesta inmunitaria pueden ser utilizadas (proteínas directamente o a través del uso de agonistas de anticuerpos) para inhibir la respuesta inmunitaria y así mejorar las enfermedades inmunitarias relacionadas.

[0015] La interleuquina-17 (IL-17) es una molécula proinflamatoria derivada de células T que estimula que las células epiteliales, endoteliales y fibroblásticas produzcan otras citoquinas inflamatorias y quimioquinas, que incluyen IL-6, IL-8, G-CSF, y MCP-1 [véase, Yao, Z. et al., J. Immunol., 122(12):5483-5486 (1995); Yao, Z. et al., Immunity, 3(6):811-821 (1995); Fossiez, F., et al., J. Exp. Med., 183(6): 2593-2603 (1996); Kennedy, J., et al., J. Interferon Cytokine Res., 16(8):611-7 (1996); Cai, X. Y., et al., Immunol. Lett, 62(1):51-8 (1998); Jovanovic, D.V., et al., J. Immunol. 160(7):3513-21 (1998); Laan, M., et al., J. Immunol., 162(4):2347-52 (1999); Linden, A., et al., Eur Respir J, 15(5):973-7 (2000); y Aggarwal, S. y Gurney, A.L., J Leukoc Biol, 71(1):1-8 (2002)]. IL-17 también muestra sinergia con otras citoquinas, que incluyen TNF- α e IL-1 β para inducir adicionalmente la expresión de quimioquinas (Chabaud, M., et al., J. Immunol. 161(1):409-14 (1998)). La interleuquina 17 (IL-17) presenta actividades biológicas pleiotrópicas en distintos tipos de células. IL-17 también tiene la capacidad de inducir la expresión en superficie de ICAM-1, la proliferación de las células T, y el crecimiento y la diferenciación de las células CD34⁺ progenitoras humanas en neutrófilos. IL-17 también se ha implicado en el metabolismo óseo, y se ha sugerido que desempeña un papel importante en condiciones patológicas caracterizadas por la presencia de células T activadas y la producción de TNF- α , como la artritis reumatoide y el aflojamiento de los implantes de hueso (Van Bezooijen et al., J. Bone Miner. Res., 14: E1 1513-1521 [1999]). Se observó que las células T activadas de tejido sinovial derivado de pacientes con artritis reumatoide secretaban cantidades más altas de IL-17 que las procedentes de personas sanas o pacientes con osteoartritis (Chabaud et al., Arthritis Rheum., 42: 963-970 [1999]). Se sugirió que esta citoquina proinflamatoria contribuye activamente en la inflamación sinovial en la artritis reumatoide. Además de su función proinflamatoria, IL-17 parece contribuir a la

patología de la artritis reumatoide mediante otro mecanismo. Por ejemplo, se ha observado que IL-17 induce la expresión del Armm del factor de diferenciación de los osteoclastos (ODF) en osteoblastos (Kotake et al., J. Clin. Invest., 103: 1345-1352 [1999]). El ODF estimula la diferenciación de las células progenitoras en los osteoclastos, las células implicadas en la reabsorción ósea. Dado que el nivel de IL-17 es significativamente mayor en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, parece que la formación de osteoclastos inducida por IL-17, desempeña un papel fundamental en la resorción ósea en la artritis reumatoide. También se cree que IL-17 juega un papel clave en algunos otros trastornos autoinmunes como la esclerosis múltiple (Matusevicius et al., Mult. Scler., 5: 101-104 (1999); Kurasawa, K., et al., Arthritis Rheu 43(11):2455-63 (2000)) and psoriasis (Teunissen, M.B., et al., J Invest Dermatol 111(4):645-9 (1998); Albanesi, C., et al., J Invest Dermatol 115(1):81-7 (2000); y Homey, B., et al., J. Immunol. 164(12):6621-32 (2000)).

[0016] También se ha observado que IL-17, mediante señalización intracelular, estimula la afluencia Ca^{2+} y una reducción en el [AMPc], en los macrófagos humanos (Jovanovic et al., J. Immunol., 160:3513 [1998]). Los fibroblastos tratados con IL-17 inducen la activación de NP-kB, [Yao et al., Immunity, 3:811 (1995), Jovanovic *et al.*, *supra*], mientras que los macrófagos tratados con ella activan NF-kB y proteínas quinasas activadas con mitógenos (Shalom-Barek et al., J. Biol. Chem., 273:27467 [1998]). Adicionalmente, IL-17 también comparte la similitud de secuencia con factor 7 de tipo citoquina de mamíferos, que está implicado en el crecimiento óseo y del cartílago. Otras proteínas con las que los polipéptidos IL-17 comparten similitud de secuencia son factores relacionados con interleuquina derivados de embriones humanos (EDMF) y la interleuquina-20.

[0017] En consonancia con el amplio rango de efectos de IL-17, el receptor de la superficie celular de la IL-17 se ha encontrado que está ampliamente expresado en muchos tejidos y tipos de células (Yao et al., Cytokine, 9:794 [1997]). Si bien la secuencia de aminoácidos de receptor humano de IL-17 (IL-1) (866 aminoácidos) predice una proteína con un único dominio de transmembrana y un dominio largo intracelular, 525 amino ácido, la secuencia del receptor es única y no es similar a la de cualquiera de los receptores de la familia de receptores de la citoquina/factor de crecimiento. Esto, unido a la falta de similitud de la IL-17 en sí a otras proteínas conocidas indica que la IL-17 y su receptor pueden ser parte de una nueva familia de proteínas y los receptores de señalización. Se ha demostrado que la actividad IL-17 está mediada por la unión a su único receptor de la superficie celular (designado en el presente documento como IL-17R humano), en la que estudios anteriores han demostrado que las células T en contacto con una forma soluble del polipéptido receptor IL-17 inhibe la proliferación de células T y la producción de IL-2 inducida por la PHA, una concanavalina A y anticuerpos monoclonales anti-TCR (Yao et al., J. Immunol., 155:5483-5486 [1995]). Como tal, existe un interés significativo en la identificación y caracterización de polipéptidos nuevos con homología con los receptores de citoquina conocidos, específicamente los receptores de IL-17.

[0018] La interleuquina 17 se ha reconocido ahora como el elemento prototipo de una familia emergentes de citoquinas. La secuenciación a gran escala del genoma humano y de otros vertebrados ha revelado la presencia de genes adicionales que codifican proteínas claramente relacionadas con IL-17, definiendo así una nueva familia de citoquinas. Existen por lo menos 6 elementos de la familia de IL-17 en humanos y ratones que incluyen IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F, así como nuevos receptores IL-17RH 1, IL-17RH2, IL-17RH3 e IL-17RH4 (véase WO01/46420 publicada el 28 de junio de 2001). Uno de dichos elementos de IL-17 (designado como IL-17F) se ha demostrado que se une al receptor de IL-17 humano (IL-17R) (Yao et al., Cytokine, 9(11):794-800 (1997)). La caracterización inicial sugiere que, como IL-17, varias de estas moléculas recientemente identificadas tienen la capacidad de modular la función inmune. Las acciones inflamatorias potentes que han sido identificadas por varios de estos factores y las asociaciones que surgen con enfermedad humanas principales sugieren que estas proteínas pueden tener papeles significativos en procesos inflamatorios y pueden ofrecer oportunidades para la intervención terapéutica.

[0019] El gen que codifica la IL-17F humana se encuentra adyacente a la IL-17 (Hymowitz, SG, et al., EMBO J, 20 (19) :5332-41 (2001)). IL-17 e IL-17F comparten el 44% de identidad de aminoácidos, mientras que los otros miembros de la familia de IL-17 comparten una identidad de aminoácidos más limitada del 15-27%, lo que sugiere que IL-17 e IL-17F forman un subgrupo distinto dentro de la familia de IL-17 (Starnes, T., et al., J Immunol, 167 (8):4137-40 (2001); Aggarwal, S. y Gurney, AL, J. Leukoc Biol., 71 (1): 1-8 (2002)). IL-17F parece tener acciones biológicas similares a IL-17, y es capaz de inducir la producción de IL-6, IL-8, y G-CSF de una amplia variedad de células. De forma similar a IL-17, es capaz de inducir la liberación de la matriz de cartílago e inhibir la síntesis de nueva matriz de cartílago (véase el documento US-2.002-0177188-A1 publicado el 28 de noviembre de 2002). Por lo tanto, igual que la IL-17, IL-17F puede contribuir potencialmente a la patología de trastornos inflamatorios. Recientemente, estos autores han observado que tanto la IL-17 como la IL-17F son inducidas en células T por la acción de la interleuquina 23 (IL-23) (Aggarwal, S., et al., J. Biol. Chem., 278 (3) :1910-4 (2003)). La observación de que IL-17 e IL-17F comparten localización cromosómica similar y una similitud de secuencia significativa, así como la observación de que IL-17 e IL-17F parecen ser inducidas con la misma población de células en respuesta a unos estímulos específicos ha llevado a la identificación de una nueva citoquina humana que se compone de un heterodímero covalente de IL-17 e IL-17F (designado en este documento IL-17A/F). El documento WO 97/04097 da a conocer que las proteínas CTLA-8 humanas también se pueden producir como heterodímeros con proteínas CTLA-8 de rata y herpes y con IL-17 humana.

[0020] La IL-17A/F humana es una citoquina claramente nueva, distinguible de la IL-17 y 1L-17F humanas, en ensayos de la estructura de proteínas y en ensayos de actividad basados en células. A través de la utilización de IL-17A/F recombinante purificada como un patrón, se ha desarrollado un ELISA específico de IL-17AF humano. A través de la utilización de esta ELISA específica, se detectó la expresión inducida de IL-17A/F humana, confirmando que la IL-17A/F se produce de forma natural a partir de células T humanas activadas en cultivo. Por lo tanto, la IL-17A/F es una citoquina claramente nueva, detectable como un producto natural de células T humanas activadas aisladas, cuya forma recombinante se ha caracterizado, en ensayos de la estructura de proteínas y en ensayos basados en células, como para ser diferente y distinguible de citoquinas relacionadas. Por lo tanto, estos estudios proporcionan e identifican un estimulante inmunitario nuevo (es decir, IL-17A/F) que pueden estimular el sistema inmunitario para responder a un antígeno particular que puede no haber sido inmunitariamente activo previamente. Por tanto, el estimulante del sistema inmunitario recientemente identificado tiene importantes aplicaciones clínicas. Esta citoquina IL-17A/F nueva o agonistas de los mismos serían útiles por tanto como un estimulante inmunitario, mientras que se espera que las moléculas que inhiben la actividad de IL-17A/F (antagonistas) sean útiles cuando se desea la inhibición de la respuesta inmunitaria, tal como en las enfermedades autoinmunes. Específicamente, los anticuerpos para esta nueva citoquina que mimetizan (anticuerpos agonistas) o inhiben (anticuerpos antagonistas) las actividades inmunitarias de IL-17A/F poseerían cualidades terapéuticas. Las moléculas pequeñas que actúan para inhibir la actividad de esta nueva citoquina también tendrían potenciales usos terapéuticos.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

A. Realizaciones

[0021] La presente invención proporciona un antagonista de un polipéptido IL-17A/F, en el que el antagonista es un anticuerpo anti-IL-17A/F, tal como se define en las reivindicaciones.

[0022] La presente descripción se refiere a composiciones y métodos útiles para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario en mamíferos, incluyendo humanos. La presente descripción se basa en la identificación de proteínas (incluyendo anticuerpos antagonistas y agonistas) que estimulan o inhiben la respuesta inmunitaria en mamíferos. Las enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario se pueden tratar mediante la supresión o potenciación de la respuesta inmunitaria. Las moléculas que potencian la respuesta inmunitaria estimulan o potencian la respuesta inmunitaria a un antígeno. Las moléculas que estimulan la respuesta inmunitaria se pueden utilizar terapéuticamente cuando el aumento de la respuesta inmunitaria sea beneficiosa. Alternativamente, se pueden usar terapéuticamente moléculas que suprimen la respuesta inmunitaria atenúan o reducen la respuesta inmunitaria a un antígeno (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) cuando la atenuación de la respuesta inmunitaria sería beneficiosa (por ejemplo, inflamación). Por consiguiente, los anticuerpos anti-IL-17A/F de la presente invención también son útiles para preparar medicinas y medicamentos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario e inflamatorias. En un aspecto específico, dichas medicinas y medicamentos comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-17A/F antagonista con un portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la mezcla es estéril.

[0023] En una realización adicional, la descripción se refiere a un método de identificación de agonistas o antagonistas de un polipéptido IL-17A/F que comprende poner en contacto el polipéptido IL-17A/F con una molécula candidata y monitorizar una actividad biológica mediada por dicho polipéptido IL-17A/F. Preferiblemente, el polipéptido IL-17A/F es un polipéptido IL-17A/F de secuencia nativa. Preferiblemente, el agonista o antagonista de IL-17A/F es un anticuerpo anti-IL-17A/F.

[0024] En otra realización, la presente invención se refiere a una composición de materia que comprende un anticuerpo antagonista de IL-17A/F de la invención en una mezcla con un portador o excipiente. En un aspecto, la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo. En un aspecto adicional, la composición es útil para: (a) disminuir la infiltración de células inflamatorias en un tejido de un mamífero con necesidad de la misma, (b) inhibir o reducir una respuesta inmunitaria en un mamífero con necesidad de la misma, (c) disminuir la actividad de linfocitos T o (d) disminuir la proliferación de linfocitos T en un mamífero con necesidad de la misma en respuesta a un antígeno. En otro aspecto, la composición comprende un principio activo adicional, que puede ser, por ejemplo, un anticuerpo adicional o un agente citotóxico o quimioterapéutico. Preferiblemente, la composición es estéril.

[0025] En otra realización, la descripción se refiere a un método de tratamiento de un trastorno relacionado con el sistema inmunitario en un mamífero con necesidad del mismo, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido IL-17A/F, un agonista del mismo, o un antagonista del mismo. En un aspecto preferente, el trastorno relacionado con el sistema inmunitario se selecciona del grupo que consiste en: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica, miopatías inflamatorias idiopáticas, síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, tiroiditis, diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmunitario, enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central y periférico, como la esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía crónica inflamatoria desmielinizante, enfermedades hepato biliares, tales como la hepatitis activa crónica infecciosa o autoinmune, cirrosis

biliar primaria, hepatitis granulomatosa y colangitis esclerosante, enfermedad inflamatoria intestinal, enteropatía sensible al gluten y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunes o mediadas por el sistema inmunitario, incluidas las enfermedades de la piel ampollosas, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas, tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a los alimentos y urticaria, enfermedades inmológicas del pulmón, tales como neumonías eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas al trasplante, tales como rechazo del injerto y enfermedad del injerto contra el huésped.

[0026] En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo, tal como se define en las reivindicaciones. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un fragmento de anticuerpo o anticuerpo de cadena única. El anticuerpo inhibe o neutraliza la actividad de un polipéptido IL-17A/F (un anticuerpo antagonista). En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, que preferiblemente tiene residuos de una región determinante de complementariedad no humana (CDR) y residuos de la región estructural humana (FR). El anticuerpo puede estar marcado y puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. En un aspecto adicional, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de cadena única o un anticuerpo anti-idiotípico. También se describe un fragmento de anticuerpo o anticuerpo de cadena única que comprende un fragmento Fab seleccionado del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 6 como la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, en el que dicho fragmento Fab comprende además tres regiones variables de cadena pesada que contienen CDR-H1 que consiste en residuos de aminoácidos 7 a 16 de SEQ ID NOs: 9-42, CDR-H2 que consiste en los residuos de aminoácido 30 a 46 de SEQ ID NOs: 9-42, y CDR-H3 que consiste en el residuo de aminoácidos 78 a a menos el residuo de aminoácido 96 de SEQ ID NOs: 9-42, en el que dicho fragmento Fab es capaz de unirse a IL-17A/F. También se describe un fragmento de anticuerpo o anticuerpo de cadena única que comprende un fragmento Fab seleccionado del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 6 como la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, en el que dicho fragmento Fab comprende además al menos una región variable de cadena pesada que contiene CDR-H1 que consiste en los residuos de aminoácidos 7 a 16 de SEQ ID NOs: 9-42, y CDR-H2 que consiste en los residuos de aminoácidos 30 a 46 de la SEQ ID NOs: 9-42, en el que dicho fragmento Fab es capaz de unirse a IL-17A/F. También se describe un fragmento de anticuerpo o anticuerpo de cadena única que comprende un fragmento Fab seleccionado del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 6 como la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, en el que dicho fragmento Fab comprende además al menos regiones variables de cadena pesada que contiene CDR-H1 que consiste en residuos de aminoácidos 7 a 16 de SEQ ID NOs: 9-42 y CDR-H3 que consiste en el residuo de aminoácido 78 a al lo menos el residuo de aminoácido 96 de SEQ ID NOs: 9-42, en el que dicho fragmento Fab es capaz de unirse a IL-17A/F. También se describe un fragmento de anticuerpo o anticuerpo de cadena única que comprende un fragmento Fab seleccionado del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 6 como la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, en el que dicho fragmento Fab comprende además al menos regiones variables de cadena pesada que contienen menos CDR-H2 que consiste en los residuos de aminoácido 30 a 46 de SEQ ID NOs: 9-42, y CDR-H3 que consiste en el residuo de aminoácido 78 a al menos el residuo de aminoácido 96 de SEQ ID NOs: 9-42, en el que dicho fragmento Fab es capaz de unirse a IL-17A/F. También se describe un fragmento de anticuerpo o anticuerpo de cadena única que comprende un fragmento Fab seleccionado del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 6 como la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42, en el que dicho fragmento Fab además comprende al menos una de región variable de la cadena pesada que contiene CDR-H1 que consiste en los residuos de aminoácidos 7 a 16 de SEQ ID NOs: 9-42, CDR-H2 que consiste en los residuos de aminoácido 30 a

46 de SEQ ID NOs: 9-42, o CDR-H3 que consiste en el residuo de aminoácido 78 a al menos el residuo de aminoácido 96 de SEQ ID NOs: 9-42, en el que dicho fragmento Fab es capaz de unirse a IL-17A/F. Opcionalmente, dicha región CDR-H1 de la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, o SEQ ID NO: 42 comprende al menos los residuos de aminoácidos 7-10 correspondiente a la secuencia amino GFTI (designado aquí como SEQ ID NO: 77), en el que dicha SEQ ID NO: 77 es capaz de unirse a IL-17A/F. Opcionalmente, dicha región CDR-H2 de la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, o SEQ ID NO: 42 comprende al menos los residuos de aminoácidos 41-46 correspondiente a la secuencia de aminoácidos YADSVK (designada aquí como SEQ ID NO: 78), en el que dicha SEQ ID NO: 78 es capaz de unirse a IL-17A/F.

[0027] En todavía otra realización, la descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75 y SEQ ID NO: 76, en la que dicha molécula de ácido nucleico codifica el fragmento Fab que se muestra como SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, o SEQ ID NO: 42, en el que dicho fragmento Fab es capaz unirse a IL-17A/F.

[0028] En otro aspecto, la descripción proporciona un fragmento de Fab aislado capaz de unirse a IL-17A/F codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos tal como se ha descrito anteriormente. Los procesos para producir los mismos también se describen aquí, en los que estos procesos comprenden cultivar una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico apropiada bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicho fragmento Fab y recuperar dicho fragmento Fab del cultivo celular.

[0029] En una realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-IL17A/F tal como se define en las reivindicaciones en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo. Preferiblemente, la composición es estéril. La composición se puede administrar en forma de una formulación farmacéutica líquida, que se puede conservar para conseguir una estabilidad de almacenamiento amplia. Alternativamente, el anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de cadena sencilla.

[0030] En una realización adicional, la presente invención se refiere a un artículo de fabricación, que comprende:
(a) una composición de materia que comprende un polipéptido IL-17A/F o un anticuerpo antagonista que se une específicamente a dicho polipéptido tal como se define en las reivindicaciones;
(b) un recipiente que contiene dicha composición; y
(c) una etiqueta fijada a dicho recipiente, o un prospecto incluido en dicho recipiente que se refiere a la utilización de dicho polipéptido IL-17A/F o agonista o antagonista del mismo en el tratamiento de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario. La composición puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo antagonista de IL-17A/F.

[0031] En el presente documento se describe un método de diagnóstico de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un mamífero, que comprende detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido IL-17A/F (a) en una muestra de prueba de células de tejido obtenidas del mamífero, y (b) en una muestra de control de células de tejido normal conocido del mismo tipo de células, en el que un nivel de expresión más elevado o inferior en la muestra de prueba en comparación con la muestra de control indica la presencia de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en el mamífero del que se obtuvieron las células de tejido de prueba.

[0032] En otra realización, la presente descripción se refiere a un método de diagnóstico de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un mamífero, que comprende (a) poner en contacto un anticuerpo anti-IL-17A/F con una muestra de prueba de células de tejido obtenidas del mamífero; y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y un polipéptido IL17A/F, en la muestra de prueba; en el que la formación de dicho complejo es indicativa de la presencia o ausencia de dicha enfermedad. La detección puede ser cualitativa o

cuantitativa, y puede realizarse en comparación con la monitorización de la formación del complejo en una muestra de control de células de tejido normal conocido del mismo tipo de células. Una mayor cantidad de complejos formados en la muestra de prueba indica la presencia o ausencia de una enfermedad inmunitaria en el mamífero del que se obtuvieron las células de tejido de prueba. El anticuerpo preferiblemente contiene un marcador detectable. La formación del complejo se puede monitorizar, por ejemplo, mediante microscopía de luz, citometría de flujo, fluorimetría u otras técnicas conocidas en el sector. La muestra de prueba se obtiene normalmente de un individuo sospechoso de tener una deficiencia o anomalía del sistema inmunitario.

[0033] En otra realización, la descripción proporciona un método para determinar la presencia de un polipéptido IL-17A/F en una muestra que comprende exponer una muestra de prueba de células sospechosas de contener el polipéptido IL-17A/F a un anticuerpo anti-IL-17A/F y determinar la unión de dicho anticuerpo a dicha muestra de células. Preferiblemente, la muestra comprende una célula sospechosa de contener el polipéptido IL-17A/F y el anticuerpo se une a la célula. El anticuerpo está preferiblemente marcado de forma detectable y/o unido a un soporte sólido.

[0034] En otra realización, la descripción se puede referir a un kit de diagnóstico de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario, que comprende un anticuerpo anti-IL-17A/F y un portador en un envase adecuado. El kit contiene preferiblemente instrucciones para utilizar el anticuerpo para detectar la presencia del polipéptido IL-17A/F. Preferiblemente, el portador es farmacéuticamente aceptable.

[0035] En otra realización, la descripción se puede referir a un kit de diagnóstico, que contiene un anticuerpo anti-IL-17A/F en un envase adecuado. El kit preferiblemente contiene instrucciones para utilizar el anticuerpo para detectar el polipéptido IL-17A/F.

[0036] En otra realización, la descripción se refiere a un método de diagnóstico de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en un mamífero que comprende detectar la presencia o ausencia de un polipéptido IL-17A/F en una muestra de prueba de células de tejido obtenidas de dicho mamífero, en el que la presencia o ausencia del polipéptido IL-17A/F en dicha muestra de prueba es indicativa de la presencia de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario en dicho mamífero.

[0037] En otra realización, la descripción se refiere a un método de identificación de un agonista de un polipéptido IL-17A/F, que comprende:

(a) poner en contacto células y un compuesto de prueba a cribar bajo condiciones adecuadas para la inducción de una respuesta celular normalmente inducida por un polipéptido IL-17A/F; y (b) determinar la inducción de dicha respuesta celular para determinar si el compuesto de prueba es un agonista eficaz, en el que la inducción de dicha respuesta celular es indicativa de que dicho compuesto de prueba es un agonista eficaz.

[0038] En otra realización, la descripción se refiere a un método para identificar un compuesto capaz de inhibir la actividad de un polipéptido IL-17A/F que comprende poner en contacto un compuesto candidato con un polipéptido IL-17A/F bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen y determinar si se inhibe la actividad del polipéptido IL-17A/F. Preferiblemente, el compuesto candidato del polipéptido IL-17A/F se inmoviliza en un soporte sólido. Preferiblemente, el componente no inmovilizado contiene un marcador detectable. Preferiblemente, este método comprende las etapas de:

(a) poner en contacto células y un compuesto de prueba a cribar en presencia de un polipéptido IL-17A/F bajo condiciones adecuadas para la inducción de una respuesta celular inducida normalmente por un polipéptido IL-17A/F; y (b) determinar la inducción de dicha respuesta celular para determinar si el compuesto de prueba es un antagonista eficaz.

[0039] En otra realización, la descripción proporciona un método para identificar un compuesto que inhibe la expresión de un polipéptido IL-17A/F en células que normalmente expresan el polipéptido, en el que el método comprende poner en contacto las células con un compuesto de prueba y determinar si se inhibe la expresión del polipéptido IL-17A/F. Preferiblemente, el método comprende las etapas de:

(a) poner en contacto células y un compuesto de prueba a cribar bajo condiciones adecuadas para permitir la expresión del polipéptido IL-17A/F; y (b) determinar la inhibición de la expresión de dichos polipéptidos.

[0040] En otra realización, la presente descripción se refiere a un método para el tratamiento de un trastorno relacionado con el sistema inmunitario en un mamífero que padece del mismo que comprende administrar al mamífero una molécula de ácido nucleico que codifica (a) un polipéptido IL-17A/F, (b) un agonista de un polipéptido IL-17A/F o (c) un antagonista de un polipéptido IL-17A/F, en el que dicho agonista o antagonista puede ser un anticuerpo anti-IL-17A/F. En una realización preferida, el mamífero es humano. En otra realización preferida, el ácido nucleico se administra a través de terapia génica in vivo. En una realización preferida adicional, el ácido nucleico está comprendido en un vector, más preferiblemente un vector adenoviral, viral adeno-asociado, lentiviral o retroviral.

[0041] En otro aspecto, la descripción proporciona una partícula viral recombinante que comprende un vector viral que consiste esencialmente en un promotor, un ácido nucleico que codifica (a) un polipéptido IL-17A/F, o (b) un polipéptido

agonista de un polipéptido IL-17A/F o (c) un polipéptido antagonista de un polipéptido IL-17A/F, y una secuencia señal para la secreción celular del polipéptido, donde el vector viral está en asociación con proteínas estructurales virales. Preferiblemente, la secuencia señal es de un mamífero, tal como de un polipéptido IL-17A/F nativo.

[0042] En una realización adicional, la descripción se refiere a una célula productora ex vivo que comprende una construcción de ácido nucleico que expresa proteínas estructurales retrovirales y también comprende un vector retroviral que consiste esencialmente en un promotor, un ácido nucleico que codifica (a) un polipéptido IL-17A/F, (b) un polipéptido agonista de un polipéptido IL-17A/F o (c) un polipéptido antagonista de un polipéptido IL-17A/F, y una secuencia señal para la secreción celular del polipéptido, en la que dicha célula productora envuelve el vector retroviral en asociación con las proteínas estructurales para producir partículas retrovirales recombinantes.

[0043] En una realización adicional, la descripción proporciona un método para aumentar la infiltración de células inflamatorias de la vasculatura en un tejido de un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero (a) un polipéptido IL-17A/F o (b) un agonista de un polipéptido IL-17A/F, en el que se aumenta la infiltración de células inflamatorias de la vasculatura en el mamífero.

[0044] En una realización adicional, la descripción proporciona un método para disminuir la infiltración de células inflamatorias de la vasculatura en un tejido de un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero (a) un polipéptido IL-17A/F o (b) un anticuerpo antagonista de un polipéptido IL-17A/F en el que se disminuye la infiltración de células inflamatorias de la vasculatura en el mamífero.

[0045] En una realización adicional, la descripción proporciona un método de incrementar la actividad de linfocitos T en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero (a) un polipéptido IL-17A/F o (b) un agonista de un polipéptido IL-17A/F, en el que se incrementa la actividad de linfocitos T en el mamífero.

[0046] En una realización adicional, la descripción proporciona a un método de disminuir la actividad de linfocitos T en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero (a) un polipéptido IL-17A/F o (b) un antagonista de un polipéptido IL-17A/F, en el que se disminuye la actividad de linfocitos T en el mamífero.

[0047] En una realización adicional, la descripción proporciona un método para incrementar la proliferación de linfocitos T en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero (a) un polipéptido IL-17A/F o (b) un agonista de un polipéptido IL-17A/F, en el que se incrementa la proliferación de linfocitos T en el mamífero.

[0048] En una realización adicional, la descripción proporciona un método para disminuir la proliferación de linfocitos T en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero (a) un polipéptido IL-17A/F o (b) un anticuerpo antagonista de un polipéptido IL-17A/F tal como se define en las reivindicaciones, en el que se disminuye la proliferación de linfocitos T en el mamífero.

[0049] En una realización adicional, la presente invención se refiere a la utilización de un anticuerpo antagonista anti-IL17A/F de la invención, para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una condición que es sensible al antagonista anti-IL-17A/F. En un aspecto particular, la descripción se refiere a la utilización de un polipéptido IL-17A/F, o un agonista o antagonista del mismo, en un método para el tratamiento de un trastorno cartilaginoso degenerativo.

[0050] En una realización adicional, la descripción se refiere a un método de tratamiento de un trastorno cartilaginoso degenerativo en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido IL-17A/F, agonista o antagonista del mismo, a dicho mamífero que padece dicho trastorno.

[0051] En una realización adicional, la presente invención se refiere a un kit que comprende una composición que comprende un anticuerpo antagonista anti-IL-17A/F de la invención en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable; un recipiente que contiene dicha composición; y una etiqueta fijada a dicho recipiente, que se refiere al uso de dicha composición, en el tratamiento de un trastorno cartilaginoso degenerativo.

B. Aspectos adicionales

[0052] En otros aspectos de la presente descripción, la descripción proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido IL-17A/F.

[0053] En un aspecto, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos

alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con (a) una molécula de ADN que codifica el mismo polipéptido maduro codificado por cualquier ADNc de proteína humana depositado con la ATCC tal como se describe en el presente documento, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

[0056] Se describen también fragmentos de una secuencia codificante de polipéptido IL-17A/F, o el complemento de la misma, que puede ser útil por ejemplo, como sondas de hibridación, para codificar fragmentos de un polipéptido IL-17A/F que puede codificar opcionalmente un polipéptido que comprende un sitio de unión para un anticuerpo anti-IL-17A/F o como sondas de oligonucleótidos antisentido. Dichos fragmentos de ácido nucleico son normalmente de por lo menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 80 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 110 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 130 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 140 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 160 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 170 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 180 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 190 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 250 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 350 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 400 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos unos aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos unos aproximadamente 500 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos unos aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 700 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 800 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos unos aproximadamente 900 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, donde en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos a la que se hace referencia más o menos el 10% de la longitud de referencia. Cabe indicar que los fragmentos nuevos de una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido IL-17A/F pueden determinarse de forma rutinaria mediante el alineamiento de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido IL-17A/F con otras secuencias de nucleótidos conocidas mediante la utilización de cualquiera de los programas de alineamiento de secuencia conocidos y la determinación de qué fragmento o fragmentos de secuencia de nucleótidos codificante del polipéptido IL-17A/F son nuevos. Todas dichas secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido se contemplan en el presente documento. También se contemplan los fragmentos de polipéptido codificados por estos fragmentos de moléculas de nucleótidos, preferiblemente aquellos fragmentos de polipéptido IL-17A/F que comprenden un sitio de unión para un anticuerpo anti-IL-17A/F.

[0057] En otro aspecto, la descripción proporciona un polipéptido IL-17A/F aislado codificado por cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos aisladas identificadas anteriormente en el presente documento.

[0058] En un cierto aspecto, la descripción se refiere a un polipéptido IL-17A/F aislado, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de aminoácidos y alternativamente por lo menos

aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos con un polipéptido IL-17A/F que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe en el presente documento, una secuencia de aminoácidos que carece del péptido señal, tal como se describe en el presente documento, o cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe en el presente documento.

[0059] En un aspecto adicional, la descripción se refiere a un polipéptido IL-17A/F aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de aminoácidos y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de los ADNc de proteína humana depositados con la ATCC tal como se describe en el presente documento.

[0060] En un aspecto adicional, la descripción se refiere a un polipéptido IL-17A/F aislado que comprende una secuencia de aminoácidos con una puntuación de por lo menos aproximadamente 80% positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 81 % positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 82% positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 83% positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 84% positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 85% positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 86% positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 87% positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 88% positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 89% positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 90% positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 91% positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 92% positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 93% positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 94% positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 95% positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 96 % positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 97% positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente 98% positivos y alternativamente por lo menos aproximadamente 99% positivos cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IL-17A/F que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe en el presente documento, una secuencia de aminoácidos que carece del péptido señal tal como se describe en el presente documento, o cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe en el presente documento.

[0061] En un aspecto específico, la descripción proporciona un polipéptido IL-17A/F aislado sin la secuencia señal N-terminal y/o la metionina de iniciación y está codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Los procesos para la producción del mismo también se describen en el presente documento, donde estos procesos comprenden el cultivo de una célula huésped que comprende un vector, el cual comprende la molécula de ácido nucleico codificante adecuada en condiciones apropiadas para la expresión del polipéptido IL-17A/F y la recuperación del polipéptido IL-17A/F del cultivo celular.

[0062] En otra realización, la presente invención se refiere a antagonistas de un polipéptido IL-17A/F nativo tal como se define en el presente documento, donde el antagonista es un anticuerpo anti-IL17A/F tal como se define en las reivindicaciones.

[0063] En un aspecto adicional, la descripción se refiere a un procedimiento de identificación de agonistas o antagonistas a un polipéptido IL-17A/F que comprende poner en contacto el polipéptido IL-17A/F con una molécula candidata y monitorizar una actividad biológica mediada por dicho polipéptido IL-17A/F. Preferiblemente, el polipéptido IL-17A/F es un polipéptido IL-17A/F nativo.

[0064] En una realización adicional, la presente invención se refiere a una composición de materia que comprende un anticuerpo antagonista anti-IL-17A/F de la invención, en combinación con un portador. Opcionalmente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable.

5 **[0065]** Otra realización de la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo antagonista anti-IL17A/F de la invención, para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una afección que es sensible al anticuerpo anti-IL-17A/F.

10 **[0066]** En aspectos adicionales de la presente descripción, la descripción proporciona vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los polipéptidos aquí descritos. También se proporcionan células huésped que comprenden cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, *E. coli*, levadura o células de insecto infectadas con Baculovirus. Se describe además un proceso para la producción de cualquiera de los polipéptidos aquí descritos y comprende el cultivo de células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y la recuperación del polipéptido deseado del cultivo celular.

15 **[0067]** En otros aspectos, la descripción proporciona moléculas quiméricas que comprenden cualquiera de los polipéptidos aquí descritos fusionados a un polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogos. Los ejemplos de dichas moléculas quiméricas comprenden cualquiera de los polipéptidos aquí descritos fusionados con una secuencia de un epítipo etiqueta o una región Fc de una inmunoglobulina.

20 **[0068]** En aun otros aspectos, la descripción proporciona sondas de oligonucleótidos útiles para el aislamiento de secuencias de nucleótidos genómicas y de ADNc o como sondas antisentido, donde estas sondas pueden derivar de cualquiera de las secuencias de nucleótidos descritas anterior o posteriormente.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0069]

La figura 1 muestra los resultados de expresar y aislar una nueva citoquina humana designada como IL-17A/F. Se transfectoron células de riñón 293 humanas con vectores de expresión de ADNc que codifican IL-17 humana e IL-17 sola o en combinación tal como se indica en la figura 1A y la figura 1B. El medio acondicionado de células transfectadas se inmunoprecipitó (IP) utilizando anticuerpos que son capaces de reconocer IL-17 (carriles 1-5), o IL-17F (carriles 6-10) tal como se indica en la figura 1A y la figura 1B. Se muestra un análisis de transferencia Western que demuestra la presencia de un complejo IL-17A/F dimérico en el carril 8 de la figura 1A y en el carril 3 de la figura 1B. El complejo IL-17A/F dimérico es consistente en tamaño con una especie heterodimérica covalente comprendida de una cadena polipeptídica de IL-17 y una cadena polipeptídica de IL-17F.

La figura 2 muestra la purificación de IL-17A/F recombinante. La figura 2A muestra los resultados de SDS-PAGE teñido con plata de fracciones de proteínas del fraccionamiento inicial de IL-17A/F en una columna de S-Sepharosa. Las fracciones 31 y 32 contienen una proteína con una peso molecular aparente de aproximadamente 33 kD consistente con IL-17A/F. La figura 2B muestra los resultados de la purificación adicional de IL-17A/F utilizando la cromatografía en columna C4 de Vydac. Se muestra el cromatógrafo de las proteínas eluidas medidas a 214 nm y 280 nm. La figura 2C demuestra que las fracciones de la proteína IL-17A/F purificada a partir de la columna de purificación C4 de Vydac induce la producción de IL-8 en células TK-10.

La figura 3 muestra los resultados del análisis de la secuencia de aminoácidos de IL-17A/F. La figura 3A muestra el análisis SDS-PAGE no reductor de IL-17A/F purificada. La proteína separada se transfirió a una membrana PVDF y se tiñó con tinción de proteínas azul de Coomassie. Las posiciones de los marcadores de peso molecular se indican en la parte derecha. La figura 3B muestra los resultados del análisis de secuencia N-terminal de IL-17A/F aislada (residuos de aminoácidos detectados a partir de un análisis de secuencia N-terminal de la banda mostrada en la figura 3A). El análisis de secuencia revela dos secuencias N-terminales (secuencia 1 designada como SEQ ID NO:1 y secuencia 2 designada como SEQ ID NO:2, respectivamente). La figura 3C muestra la secuencia de aminoácidos de IL-17 humana (mostrada en la figura 3C y la figura 8, designada como SEQ ID NO:3) y la secuencia de aminoácidos de IL-17F humana (mostrada en la figura 3C y la figura 10, designada como SEQ ID NO:4). Las secuencias señal de IL-17 e IL-17F están subrayadas. Las secuencias que tienen identidad con las dos secuencias peptídicas N-terminales (SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2) presentes en IL-17A/F están destacadas en negrita para las secuencias de los polipéptidos IL-17 e IL-17F mostrados.

La figura 4 muestra el análisis por espectrometría de masas de IL-17A/F. La figura 4A es un esquema que muestra la secuencia de aminoácidos con sus enlaces disulfuro entre cadenas e intracadenas del heterodímero de IL-17A/F maduro (SEQ ID NO:77). Las cisteínas implicadas en los enlaces disulfuro se indican por un puntito, (*), y el número de residuo. Los enlaces disulfuro se indican mediante líneas negras que conectan las cisteínas unidas. Los enlaces disulfuro que forman enlaces disulfuro entre cadenas están destacados en líneas en negrita. La figura 4B muestra el esquema de los fragmentos 1 y 2 del péptido IL-17A/F que contiene enlaces disulfuro entre la cadena de IL-17 y la cadena de IL-17F que se anticiparía para ser producidos mediante la digestión de IL-17A/F con tripsina [el fragmento 1 del enlace disulfuro de IL-17A/F se designa como SEQ ID NO:7; el fragmento del enlace disulfuro de IL-17A/F se

designa como SEQ ID NO:8, respectivamente]. Los aminoácidos contenidos en estos fragmentos se indican y numeran en relación con la metionina de iniciación de cada cadena. También se indica el peso molecular aproximado calculado de estos fragmentos que se esperaría observar mediante espectrometría de masas. La figura 4C muestra la localización del péptido IL-17A/F con espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF). La localización del péptido resultante contiene picos con $[M+H]^+ = 2420,12$ Da y $3410,60$ Da, consistente con los péptidos unidos por puentes disulfuro. La figura 4D demuestra la caracterización adicional de muestras no reducidas de IL-17A/F mediante espectrometría de masas de producción de iones con ionización por electrospray con cromatografía líquida (LC-ESI-MS). Los cromatogramas de iones representan (de arriba abajo) el cromatograma de iones totales, el cromatograma de iones reconstruidos (RIC) del fragmento 2 del enlace disulfuro de IL-17A/F $[M+2H]^+_{2+}$, y el fragmento 1 del enlace disulfuro de IL-17A/F $[M+2H]^+_{3+}$. Se observaron picos consistentes con ambos heterodímeros, mientras que no se observaron picos por encima del ruido químico de fondo en las masas anticipadas para péptidos homodiméricos.

La figura 5A muestra las curvas de dosis-respuesta comparando la respuesta proinflamatoria inducida por IL-17A/F, IL-17 e IL-17F. IL-17A/F, IL-17 e IL-17F se incubaron con células TK-10 en las concentraciones indicadas durante 24 horas. Se observó que IL-17A/F tenía una actividad inductora de IL-8 potente con una actividad sustancial observada a concentraciones sub-nM.

La figura 5B muestra las curvas dosis-respuesta comparando la inducción de IL-6 por IL-17A/F, IL-17 e IL-17F. IL-17A/F, IL-17 e IL-17F se incubaron con células TK-10 en las concentraciones indicadas durante 24 horas. El medio acondicionado con TK-10 se recogió y analizó mediante ELISA de IL-6.

La figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de la región de la región variable de cadena pesada que contenía CDR H1-H3 de Fab que se une a IL-17A/F. Se muestra la alineación de una región de la secuencia de aminoácidos predicha de treinta y cuatro (34) clones (SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:42, respectivamente) que codifican distintas secuencias de cadena pesada de anticuerpo que son capaces de unirse a IL-17A/F. Las tres regiones CDR de cadena pesada (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) están sombreadas.

La figura 7 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:5) de un ADNc de IL-17 de secuencia nativa.

La figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:3) derivada de la secuencia codificante de SEQ ID NO:5 mostrada en la figura 7.

La figura 9 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:6) de un ADNc de IL-17F de secuencia nativa.

La figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:4) derivada de la secuencia codificante de SEQ ID NO:6 mostrada en la figura 9.

La figura 11 muestra las mediciones de ELISA IL-17A/F de IL-17A/F producida de células T humanas con anti-CD3/anti-CD28 activados.

La figura 12 muestra la especificidad del ELISA IL-17A/F en la que se observó que tres fracciones 31-33 analizadas en paralelo contenían cantidades casi equivalentes de IL-17A/F (IL-17A e IL-17F se utilizaron como controles).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

I. Definiciones

[0070] Un "polipéptido IL-17A/F de secuencia nativa" comprende un polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido IL-17A/F correspondiente derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos IL-17A/F de secuencia nativa pueden ser aislados de la naturaleza o pueden ser producidos por medios recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido IL-17A/F de secuencia nativa" abarca específicamente formas truncadas o secretadas naturales del polipéptido IL-17A/F específico (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas empalmadas alternativamente) y variantes alélicas naturales del polipéptido. En varias realizaciones de la invención, los polipéptidos IL-17A/F de secuencia nativa aquí descritos son polipéptidos de secuencia nativa maduros o de longitud completa que comprenden las secuencias de aminoácidos de longitud completa que se muestran en las figuras adjuntas. Los codones de inicio y detención se muestran en negrita y subrayado en las figuras. Sin embargo, aunque los polipéptidos IL-17A/F descritos en las figuras adjuntas se muestran que comienzan con residuos de metionina designados aquí como el aminoácido de posición 1 en las figuras, es concebible y posible que otros residuos de metionina situados antes o después de la posición 1 del aminoácido en las figuras puedan ser empleados como residuo de aminoácido de inicio para los polipéptidos IL-17A/F.

[0071] La ubicación aproximada de los "péptidos señal" de los diferentes polipéptidos IL-17A/F aquí descritos se muestran en la presente memoria y/o en las figuras adjuntas. Cabe señalar, sin embargo, que el C-terminal del límite de un péptido señal puede variar, pero muy probablemente en no más de 5 aminoácidos de cada lado de la señal de

péptido C-terminal del límite, tal como inicialmente se identificó aquí, en donde el límite terminal C del péptido señal puede ser identificado con arreglo a los criterios empleados habitualmente en la técnica para determinar ese tipo de elemento de la secuencia aminoácidos (por ejemplo, Nielsen et al., Prot. Eng., 10:1-6 (1997) Y Von Heinje et al., Nucl. Acids. Res., 14:4683-4690 (1986)). Por otra parte, también se reconoce que, en algunos casos, la escisión de una

5 secuencia de la señal de un polipéptido secretado no es totalmente uniforme, lo que resulta en más de una especie segregada. Estos polipéptidos maduros, donde el péptido señal se corta en no más de 5 aminoácidos en ambos lados del límite C-terminal del péptido señal aquí identificado, y los polinucleótidos que codifica, son contemplados por la presente invención.

10 **[0072]** "Variante de polipéptido IL-17A/F" significa un polipéptido IL-17A/F activo, tal como se define anterior o posteriormente que tiene por lo menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con una secuencia de longitud completa de la secuencia nativa del polipéptido IL-17A/F tal como se describe en el presente documento, una

15 secuencia polipeptídica de IL-17A/F que carece de péptido señal tal como se describe en el presente documento, o cualquier otro fragmento de una secuencia de longitud completa del polipéptido IL-17A/F tal como se describe en el presente documento. Estas variantes de polipéptido IL-17A/F incluyen, por ejemplo, polipéptidos IL-17A/F en los que uno o más residuos de aminoácidos se agregan o se eliminan, en el extremo N- o C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Por lo general, una variante de polipéptido IL-17A/F tendrá por lo menos un

20 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos aproximadamente un 81% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos un 82% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos, un 83% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos, un 84% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos el 85% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos, un 86% de identidad de la secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos un 87% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos

25 aproximadamente un 88% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos, aproximadamente un 89% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos, un 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos un 91% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos, un 92% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos, un 93% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos, aproximadamente un 94% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos, un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos un 96% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos un 97% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos, un 98% de identidad de secuencia de aminoácidos y, alternativamente, por lo menos un 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de longitud completa de la secuencia nativa de polipéptido IL-17A/F tal como se describe en el presente documento, una secuencia de polipéptido IL-17A/F que carece de péptido señal tal como se describe en el

30 presente documento, o cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia de polipéptido IL-17A/F de longitud completa tal como se describe en el presente documento. Normalmente, los polipéptidos variantes de IL-17A/F tienen por lo menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, alternativamente, por lo menos, aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, alternativamente, por lo menos, aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, alternativamente, por lo menos, aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, alternativamente, por lo menos, aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, alternativamente, por lo menos, aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, alternativamente, por lo menos, aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, alternativamente, por lo menos, aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, alternativamente, por lo menos, aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, alternativamente, por lo menos, aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, alternativamente, por lo menos, aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, alternativamente, por lo menos, aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, alternativamente, por lo menos, aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, o más.

35 **[0073]** "Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de polipéptido IL-17A/F identificadas aquí se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia específica de polipéptido IL-17A/F, después de alinear las secuencias y de introducir separaciones, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación a efectos de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que están en la capacidad del sector de la técnica, por ejemplo, utilizando los programas informáticos a disposición

40 del público como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima sobre toda la longitud de las secuencias que se comparan. A efectos de la presente, sin embargo, los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan mediante el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, donde el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 siguiente. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue escrito por Genentech, Inc. y el código fuente que se muestra en la tabla 1 se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Copyright de EE.UU., Washington DC, 20559, donde se registró con el N° de registro de autor de EE.UU. No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible para el público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede ser compilado desde el código fuente en la Tabla 1 siguiente. El programa ALIGN-2 debe ser

45 compilado para uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente Digital UNIX V4.0D. Todos los parámetros de

comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

[0074] En situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para la comparación de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A respecto a, con, o en contra de una secuencia de aminoácidos B determinada (que, alternativamente, se puede expresar como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o cuenta con un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a, con, o en contra de una determinada secuencia de aminoácidos B) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácidos calificados como exactamente idénticos por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en la alineación de ese programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se entenderá que, cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de A respecto a B no será igual al % de identidad de la secuencia aminoácidos de B respecto a A. Como ejemplos cálculos de % de identidad de la secuencia de aminoácidos utilizando este procedimiento, las tablas 2 y 3 muestran cómo calcular el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos designado "Proteínas de Comparación" con respecto a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido hipotético de interés, "Proteínas de Comparación", representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido contra el que compara el polipéptido de interés, y "X" Y "y" Z ", representan cada uno diferentes residuos de aminoácidos hipotéticos.

[0075] A menos que se indique lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en este documento se obtienen tal como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2. Sin embargo, los valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos también se pueden obtener tal como se describe a continuación utilizando el programa informático WU-BLAST-2 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda WU-BLAST-2 se ajustan a los valores por defecto. Los valores no ajustados por defecto, es decir, los parámetros ajustables, se establecen con los siguientes valores: superposición = 1, fracción de superposición = 0,125, límite de palabra (T) = 11, y matriz de puntuación = BLOSUM62. Cuando se emplea WU-BLAST-2, se determina un valor de % de identidad de secuencias de aminoácidos dividiendo (a) el número de residuos de aminoácidos idénticos entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido de interés que tiene una secuencia derivada del polipéptido nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia contra la cual el polipéptido de interés se está comparando que puede ser una variante de polipéptido IL-17A/F) según lo determinado por WU-BLAST-2 por (b) el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido de interés. Por ejemplo, en la afirmación de "un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A que tiene o que tenga por lo menos el 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos B", la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de comparación de la "Proteína de comparación" de interés y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del polipéptido de interés.

[0076] El porcentaje de identidad de secuencia de aminoácido también puede determinarse utilizando el programa de comparación de las secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> u obtenerse de la National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 utiliza varios parámetros de búsqueda, en donde todos los parámetros de búsqueda se fijan a los valores predeterminados, incluyendo, por ejemplo, desenmascarar = sí, cadena = todo, sucesos esperados = 10, longitud mínima de baja complejidad = 15/5, valor-e pase múltiple = 0,01, constante de pase múltiple = 25, caída de alineación separada final = 25 y matriz de puntuación = BLOSUM62.

[0077] En las situaciones en que se utiliza NCBI-BLAST2 para la comparación de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A determinada respecto a, con, o en contra de una determinada secuencia de aminoácidos B (que, alternativamente, se puede expresar como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o cuenta con un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a, con, o en contra de una determinada secuencia de aminoácidos B) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácidos calificados como exactamente idénticos por el programa de alineación de secuencias BLAST2 NCBI en la alineación de ese programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se entenderá que, cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de A respecto a B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácido de B respecto a A.

[0078] "Variante de polinucleótido IL-17A/F" o "secuencia de ácidos nucleicos variante de IL-17A/F" significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido IL-17A/F activo, tal como se define a continuación y que tiene por lo menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleótidos que codifica una secuencia de polipéptido IL-17A/F de secuencia nativa y de longitud completa tal como

se describe en el presente documento, una secuencia de polipéptido IL-17A/F de secuencia nativa y de longitud completa que carece de péptido señal tal como se describe en el presente documento, o cualquier otro fragmento de una secuencia de un polipéptido IL-17A/F de longitud completa tal como se describe en el presente documento. Normalmente, una variante de polinucleótido IL-17A/F tendrá por lo menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente, por lo menos aproximadamente el 81% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente el 82% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente el 83% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente el 84% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente el 85% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente el 86% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente el 87% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente el 88% de la identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente por lo menos aproximadamente el 89% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente el 91% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente el 92% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente el 93% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente el 94% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente el 96% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos, aproximadamente el 97% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente el 98% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos y, alternativamente, por lo menos aproximadamente el 99% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de polipeptido IL-17A/F de secuencia nativa y de longitud completa tal como se describe en el presente documento, una secuencia de polipéptido IL-17A/F de secuencia nativa y de longitud completa que carece del péptido señal tal como se describe en el presente documento, o cualquier otro fragmento de una secuencia de longitud completa de polipéptido IL-17A/F tal como se describe en el presente documento. Las variantes no abarcan la secuencia de nucleótidos nativa.

[0079] Normalmente, las variantes de polinucleótidos IL-17A/F tienen por lo menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 180 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 210 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 240 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 270 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 900 nucleótidos de longitud, o más.

[0080] "Porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácidos nucleicos" con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido IL-17A/F identificadas aquí se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos de IL-17A/F de interés, después de alinear las secuencias y de introducir separaciones, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de la secuencia. La alineación a efectos de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos puede lograrse de varias maneras que están en la capacidad del sector de la técnica, por ejemplo, utilizando los programas informáticos a disposición del público como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). A efectos de la presente, sin embargo, los valores del % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos se generan mediante el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, donde el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 siguiente. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue escrito por Genentech, Inc. y el código fuente que se muestra en la tabla 1 se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Copyright de EE.UU., Washington DC, 20559, donde se registró con el N° de registro de autor de EE.UU. No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible para el público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede ser compilado desde el código fuente en la Tabla 1 siguiente. El programa ALIGN-2 debe ser compilado para uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente Digital UNIX V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

[0081] En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para las comparaciones de secuencia de ácidos nucleicos, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos determinada C a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de ácidos nucleicos determinada C que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D) se calcula tal y como se indica a continuación:

100 veces la fracción W/Z

donde W es el número de nucleótidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de

secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de C a D no será igual al % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de D a C. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, las Tablas 4 y 5 demuestran cómo calcular el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de ácidos nucleicos denominada "ADN de comparación" con la secuencia de ácidos nucleicos denominada "IL-17A/F-DNA", donde "IL-17A/F-DNA" representa una secuencia de ácidos nucleicos hipotética que codifica IL-17A/F de interés, "ADN de comparación", representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico contra la que se compara la molécula de ácido nucleico "IL-17A/F-DNA" de interés, y "N", "L" y "V" cada uno representa nucleótidos hipotéticos.

[0082] A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores del % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos utilizados aquí se obtienen tal como se describe en párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2. Sin embargo, los valores del % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos también se pueden obtener tal como se describe a continuación utilizando el programa informático WU-BLAST-2 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se fijan a los valores predeterminados. Los valores no predeterminados, es decir, los parámetros ajustables, se fijan con los siguientes valores: superposición = 1, fracción de superposición = 0,125, límite de palabra (T) = 11, y matriz de puntuación = BLOSUM62. Cuando se utiliza WU-BLAST-2, el valor del % de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos se determina dividiendo (a) el número de nucleótidos idénticos entre la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácidos nucleicos de interés que codifica el polipéptido IL-17A/F que tiene una secuencia derivada del ácido nucleico que codifica el polipéptido IL-17A/F de secuencia nativa y la molécula de ácido nucleico de interés de comparación (es decir, la secuencia contra la que se compara la molécula de ácido nucleico de interés que codifica el polipéptido IL-17A/F que puede ser una variante del polipéptido IL-17A/F) tal como se determina mediante WU-BLAST-2, entre (b) el número total de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico de interés que codifica el polipéptido IL-17A/F. Por ejemplo, en la afirmación "una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico A que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con la secuencia de ácidos nucleicos B", la secuencia de ácidos nucleicos A es la molécula de ácido nucleico de interés de comparación y la secuencias de ácidos nucleicos B es la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácidos nucleicos de interés que codifica el polipéptido IL-17A/F

[0083] El porcentaje de identidad de secuencia de aminoácido también puede determinarse utilizando el programa de comparación de las secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> u obtenerse de la National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 utiliza varios parámetros de búsqueda, en donde todos los parámetros de búsqueda se fijan a los valores predeterminados, incluyendo, por ejemplo, desenmascarar = sí, cadena = todo, sucesos esperados = 10, longitud mínima de baja complejidad = 15/5, valor-e pase múltiple = 0,01, constante de pase múltiple = 25, caída de alineación separada final = 25 y matriz de puntuación = BLOSUM62.

[0084] En las situaciones en las que se utiliza NCBI-BLAST2 para la comparación de secuencias, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos determinada C a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de ácidos nucleicos determinada C que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D) se calcula tal y como se indica a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción } W/Z$$

donde W es el número de nucleótidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias NCBI-BLAST2 en dicha alineación del programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de C a D no será igual al % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de D a C.

[0085] En otras realizaciones, las variantes de polinucleótidos IL-17A/F son moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido IL-17A/F activo y que son capaces de hibridarse, preferiblemente bajo condiciones de hibridación y lavado rigurosas, a secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido IL-17A/F de longitud completa tal como se describe en el presente documento. Las variantes de polipéptidos IL-17A/F pueden ser aquellas que se codifican por una variante de polinucleótido de IL-17A/F.

[0086] El término "aislado", cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos aquí descritos, significa polipéptidos que se han identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, se purificará el polipéptido (1) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* en el interior de

células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del polipéptido IL-17A/F no estará presente. Normalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0087] Una molécula de ácido nucleico "aislada" que codifica un polipéptido IL-17A/F u otro ácido nucleico que codifica el polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido está en una forma o composición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican el polipéptido se diferencian de la molécula de ácido nucleico específica que codifica el polipéptido tal y como existen en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido incluye moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido contenidas en células que normalmente expresan el polipéptido, cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

[0088] El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

[0089] Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se utilizan los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

[0090] La "astringencia" o "rigurosidad" de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto habitual en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sal. En general, sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación más correcta, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un medio por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia de hibridación, mayor es la temperatura relativa que se puede utilizar. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas superiores tenderían a hacer las condiciones de reacción más astringentes, mientras que temperaturas inferiores no tanto. Para detalles adicionales y explicaciones de la astringencia de las reacciones de hibridación, ver Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

[0091] "Condiciones astringentes" o "condiciones de astringencia elevada", tal y como se definen en el presente documento, se pueden identificar por aquéllas que: (1) utilizan una fuerza iónica baja y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) utilizan durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficol al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) utilizan formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado de astringencia elevada que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

[0092] Las "condiciones moderadamente astringentes" se pueden identificar tal y como se describen en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluye la utilización de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos astringentes que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente astringentes es la incubación durante toda la noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 20 mg/ml, seguido del lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 35-50°C. El experto en la materia sabrá como ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. necesarias para acomodar factores, tales como la longitud de la sonda y similares.

[0093] El término "epítipo etiquetado", cuando se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido IL-17A/F fusionado a un "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene residuos suficientes para proporcionar un epítipo contra el que se puede fabricar un anticuerpo, aunque es suficientemente corto, de manera que no interfiere en la actividad del polipéptido al que se fusiona. El polipéptido etiqueta es también preferiblemente bastante único, de manera que el anticuerpo sustancialmente no reacciona de forma cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente por lo menos seis residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).

[0094] Tal como se utiliza aquí, el término "inmuno adhesina", designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden la fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento y unión a antígeno de un anticuerpo (es decir es "heteróloga"), y de una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina es típicamente una secuencia contigua de aminoácidos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la inmuno adhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluidos IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD o IgM.

[0095] El término "antagonista" se utiliza en el sentido amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido nativo IL-17A/F descrito aquí. De una manera similar, el término "agonista" se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que mimetiza una actividad biológica de un polipéptido nativo IL-17A/F descrito aquí. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos antagonistas o agonistas o fragmentos de anticuerpo, fragmentos o variantes de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos IL-17A/F, péptidos, oligonucleótidos antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido IL-17A/F pueden comprender poner en contacto un polipéptido IL-17A/F con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas asociadas normalmente con el polipéptido IL-17A/F.

[0096] "Tratamiento" se refiere al tratamiento terapéutico y a medidas profilácticas o preventivas, donde el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección patológica o trastorno objetivo. Los que tienen necesidad del tratamiento incluyen aquellos que ya padecen el trastorno, así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se debe prevenir el trastorno.

[0097] Administración "crónica" se refiere a la administración del agente o agentes de un modo continuo en oposición a un modo agudo, para mantener el efecto (actividad) terapéutica inicial durante un periodo de tiempo largo. Administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza consecutivamente sin interrupción, sino que es más bien cíclico por naturaleza.

[0098] El término "mamífero" con el propósito de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo el hombre, animales domésticos y de granja, y animales del zoo, deportivos o de compañía, tales como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos etc. Preferiblemente, el mamífero es el hombre.

[0099] La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (a la vez) y la administración consecutiva en cualquier orden.

[0100] "Portadores", tal como se utiliza aquí, incluyen los portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, que no son tóxicos para la célula o para el mamífero que se expone a los mismos en las dosificaciones y concentraciones utilizadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada de pH. Ejemplos de portadores aceptables fisiológicamente incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferiores a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como la glicina, la glutamina, la asparagina, la arginina o la lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo la glucosa, la manosa, o las dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

[0101] El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-IL-17A/F individuales (incluyendo anticuerpos agonista, antagonista, y neutralizante), composiciones de anticuerpos anti-IL-17A/F con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos anti-IL-17A/F de cadena única, y fragmentos de anticuerpos anti-IL-17A/F (ver a continuación), siempre y cuando muestren la actividad biológica o inmunológica deseadas. El término "inmunoglobulina" (Ig) se utiliza indistintamente con el anticuerpo del presente documento.

[0102] Un "anticuerpo aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, se purificará el anticuerpo (1) en más de un 95% en peso del anticuerpo determinado por el método de Lowry, y aún más preferiblemente en más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0103] La unidad básica del anticuerpo de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en 5 de la unidad heterotetramérica básica junto con un polipéptido adicional denominado cadena J y, por tanto, contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizarse para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgGs, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150.00 daltons. Cada cadena L está unida a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro que dependen del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente separados. Cada cadena H tiene en el extremo N-terminal un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N-terminal un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L juntos forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8ª Edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6.

[0104] La cadena L de cualquier especie vertebrada se puede asignar a uno de los dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen las cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases en base a diferencias relativamente menores en la secuencia y la función de C_H , por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

[0105] El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo del tramo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes denominados regiones armazón ("framework") (FRs) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una de 9 a 12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina beta, conectadas mediante tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas de manera próxima mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

[0106] El término "región hipervariable", cuando se utiliza aquí, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende en general residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (es decir, alrededor aproximadamente los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el V_L y alrededor aproximadamente 1-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el V_H ; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD. [1991]) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el V_L y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el V_H ; Clothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 [1987]).

[0107] El término "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una

población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que están dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales presentan la ventaja de que pueden ser sintetizados no contaminados por otros anticuerpos. El calificativo "monoclonal" no debe interpretarse que se requiere un procedimiento particular para la producción del anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usan de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse por la metodología del hibridoma descrita por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 [1975], o por procedimientos de ADN recombinante en células bacterianas, eucariotas, animales o plantas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse, por ejemplo, de bibliotecas de anticuerpos en fagos según las técnicas descritas en Clackson y et al., *Nature*, 352:624-628 [1991] y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991).

[0108] Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (véase la patente de Estados Unidos No. 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 6851-6855 [1984]). Los anticuerpos quiméricos de interés del presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del viejo mundo, simio, etc.) y secuencias de la región constante humana.

[0109] Un anticuerpo "intacto" es aquel que comprende un sitio de unión a antígeno, así como un C_L y por lo menos los dominios constantes de cadena pesada C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variante en la secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

[0110] Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diabodies; anticuerpos lineales (véase la Patente de Estados Unidos No. 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0111] La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab" y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento de Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, presenta un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento F(ab')₂ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos de Fab unidos por puentes disulfuro que tienen una actividad de unión a antígeno divalente y aún es capaz de reticular con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de una serie de residuos en el extremo carboxi terminal del dominio C_{H1} que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación aquí para Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes transportan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos de Fab' que tienen cisteínas bisagras entre ellos. También se conocen otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0112] El fragmento Fc comprende las partes carboxi terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas mediante enlaces disulfuro. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan mediante las secuencias en la región Fc, cuya región es también la parte reconocida por receptores Fc (FcR) hallados en ciertos tipos de células.

[0113] "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en asociación estrecha no covalente. A partir del pliegue de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada una de las cadenas H y L) que contribuyen con los residuos de aminoácidos para la unión a antígeno y que confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una Fv que comprende sólo tres CDRs específicas de antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

[0114] "Fv de cadena única", también abreviado como "sFv" o "scFv", son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios de anticuerpos V_H y V_L conectados en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende además un enlace polipéptido entre los dominios V_H y V_L, que permite a sFv formar la estructura

deseada para la unión del antígeno. Para una revisión de sFv, véase *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore, eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

[0115] El término "diabodies" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados mediante la construcción de fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con enlazadores cortos (aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L, de manera que se consigue el emparejamiento de los dominios V entre cadenas, pero no intracadenas, dando lugar a un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diabodies biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos de sFv de entrecruce ("crossover"), donde los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diabodies se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

[0116] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedor) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) donde los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad de anticuerpo, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región armazón ("framework") (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo dador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

[0117] Un "anticuerpo dependiente de especie", por ejemplo, un anticuerpo anti-IgE humano de mamífero, es un anticuerpo que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie mamífera que la que tiene por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de especie "se une específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (K_d) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} y lo más preferible no más de aproximadamente 1×10^{-9} M), pero presenta una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humana que es por lo menos aproximadamente 50 veces, o por lo menos aproximadamente 500 veces, o por lo menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos definidos anteriormente, pero preferiblemente es un anticuerpo humanizado o humano.

[0118] Un "oligopolipéptido de unión a IL-17A/F" es un oligopéptido que se une, preferiblemente específicamente, a un polipéptido IL-17A/F tal como se describe en el presente documento. Los oligopéptidos de unión a IL-17A/F se pueden sintetizar químicamente utilizando una metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificar utilizando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión a IL-17A/F tienen habitualmente por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ó 100 aminoácidos de longitud o más, donde dichos oligopéptidos son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido IL-17A/F tal como se describe en el presente documento. Los oligopéptidos de unión a IL-17A/F se pueden identificar sin una gran experimentación utilizando técnicas bien conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de oligopéptidos para oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; Publicación PCT Nos. WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 3998-4002 (1984); Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 178-182 (1985); Geysen et al., in *Synthetic Peptides as Antigens*, 130-149 (1986); Geysen et al., *J. Immunol. Meth.*, 102: 259-274 (1987); Schoofs et al., *J. Immunol.*, 140: 611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6378; Lowman, H.B. et al. (1991) *Biochemistry*, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) *Nature*, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991). *J. Mol. Biol.*, 222: 581; Kang, A.S. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 8363, y Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2: 668).

[0119] Una "molécula orgánica de unión a IL-17A/F" es una molécula orgánica diferente de un oligopéptido o anticuerpo tal como se define aquí, que se une, preferiblemente específicamente, a un polipéptido IL-17A/F tal como se describe en el presente documento. Las moléculas orgánicas de unión a IL-17A/F se pueden identificar y sintetizar químicamente utilizando metodología conocida (véase, por ejemplo, Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas de unión a IL-17A/F tienen habitualmente menos de aproximadamente 2000

daltons de tamaño, alternativamente menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 ó 200 daltons de tamaño, donde dichas moléculas orgánicas que son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido IL-17A/F tal como se describe en el presente documento, se pueden identificar sin una gran experimentación utilizando técnicas bien conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de moléculas orgánicas para moléculas que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585).

[0120] Un anticuerpo, oligopéptido, u otra molécula orgánica “que se une” a un antígeno de interés, por ejemplo, un polipéptido antígeno diana asociado a un tumor, es aquel que se une al antígeno con suficiente afinidad, de manera que el anticuerpo, oligopéptido, u otra molécula orgánica es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en el reconocimiento de una célula o tejido que expresan el antígeno, y no reacciona significativamente de forma cruzada con otras proteínas. En dichas realizaciones, el grado de unión del anticuerpo, oligopéptido, u otra molécula orgánica a una proteína “no diana” será inferior a aproximadamente un 10% de la unión del anticuerpo, oligopéptido, u otra molécula orgánica a su proteína diana particular tal como se determina mediante un análisis mediante separador celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). Con respecto a la unión de un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a una molécula diana, el término “unión específica” o “que se une específicamente a” o es “específico para” un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido diana particular significa una unión que es diferente de forma medible de una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar mediante la competición con una molécula de control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, se indica unión específica si la unión de la diana marcada a una sonda es inhibida competitivamente por un exceso de diana no marcada. El término “unión específica” o “que se une específicamente a” o es “específico para” un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido diana particular tal como se utiliza aquí se pueden mostrar, por ejemplo, mediante una molécula que tiene una Kd para la diana de por lo menos aproximadamente 10^{-4} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-5} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-6} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-7} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-8} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-10} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-11} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-12} M, o superior. En una realización, el término “unión específica” se refiere a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido particular sin unirse específicamente a cualquier otro polipéptido o epítipo en polipéptido.

[0121] Un anticuerpo, oligopéptido, u otra molécula orgánica que “inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan un polipéptido IL-17A/F” o un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica “inhibidora del crecimiento” son aquellos que dan lugar a una inhibición de crecimiento medible de las células cancerosas que expresan o sobreexpresan el polipéptido IL-17A/F apropiado. Los anticuerpos anti-IL-17A/F, oligopéptidos, o moléculas orgánicas inhibidoras del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de las células tumorales que expresan IL-17A/F en más de un 20%, preferiblemente de aproximadamente un 20% a aproximadamente un 50% e incluso, más preferiblemente, en más de un 50%, (por ejemplo, de aproximadamente un 50% a aproximadamente un 100%), en comparación con el control apropiado, siendo habitualmente el control células tumorales no tratadas con el anticuerpo, oligopéptido, u otra molécula orgánica a analizar. En una realización, la inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,1 a 30 $\mu\text{g/ml}$ o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. La inhibición del crecimiento de las células tumorales in vivo se puede determinar de varias maneras. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento in vivo si la administración del anticuerpo anti-IL-17A/F a aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da lugar a la reducción en el tamaño tumoral o proliferación de células tumorales en aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferiblemente en aproximadamente 5 a 30 días.

[0122] Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que “induce apoptosis” es aquel que induce la muerte celular programada determinada mediante la unión de annexina V, la fragmentación de ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplasmático, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). La célula es normalmente aquella que sobreexpresa un polipéptido IL-17A/F. Preferiblemente, la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de próstata, mama, ovario, estómago, endometrio, pulmón, riñón, colón, o vejiga. Existen varios métodos disponibles para evaluar los eventos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de la fosfatidil serina (PS) se puede medir mediante la unión a annexina; la fragmentación de ADN se puede evaluar a través del “laddering” del ADN; y la condensación nuclear/cromatina junto con la fragmentación de ADN se pueden evaluar mediante cualquier aumento en células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo, el oligopéptido u otra molécula orgánica que induce la apoptosis es aquel que da lugar de aproximadamente 2 a 50 veces, preferiblemente de aproximadamente 5 a 50 veces, y aún más preferiblemente de aproximadamente 10 a 50 veces, la inducción de unión a annexina en relación a célula no tratada en un ensayo de unión a annexina.

[0123] Las “funciones efectoras” de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc

(una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de una variante en la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen la unión a C1q y la citotoxicidad dependiente de complemento; la unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; subregulación de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y la activación de células B.

[0124] "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refieren a una forma de citotoxicidad en que la Ig secretada unida a receptores de Fc (FcRs) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas ("killer") naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta el antígeno y, posteriormente, destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" las células citotóxicas y son absolutamente necesarias para dicha destrucción. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII solo, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). Para determinar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo ADCC in vitro, tal como el descrito en las patentes de Estados Unidos 5.500.362 ó 5.821.337. Células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede determinar in vivo, por ejemplo en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:652-656 (1998).

[0125] Los términos "receptor Fc" o "FcR" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. La FcR preferida es una FcR humana de secuencia nativa. Además, una FcR preferida es aquella que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas ("spliced") de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (revisado en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Los FcRs se revisan en Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están comprendidos por el término "FcR" aquí. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgGs maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587 (1976); y Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

[0126] "Células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan por lo menos FcγRIII y realizan la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las células PBMCs y NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

[0127] "Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refieren a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación del mecanismo de complemento clásico se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para determinar la activación del complemento se puede realizar un ensayo CDC, por ejemplo tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

[0128] La palabra "marcador" cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo a fin de generar un anticuerpo "marcado". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la modificación química de un compuesto o una composición de sustrato que es detectable.

[0129] Por "en fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que el anticuerpo de la presente invención se puede adherir. Ejemplos de fases sólidas abarcadas aquí incluyen las constituidas total o parcialmente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En algunas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo, en otros es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, como las descritas en la patente US 4.275.149.

[0130] Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o surfactantes que es útil para la entrega de un medicamento (por ejemplo, un polipéptido IL-17A/F o de su anticuerpo) a un mamífero. Los componentes de los liposomas están comúnmente dispuestos en una formación de doble capa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

[0131] Una "pequeña molécula" se define en aquí por tener un peso molecular inferior a 500 Daltons.

[0132] El término "modular" significa afectar (por ejemplo, ya sea regular al alza, regular a la baja o controlar de otra forma) el nivel de una vía de señalización. Los procesos celulares bajo el control de la transducción de señales incluyen, pero no están limitados a, la transcripción de genes específicos, las funciones celulares normales, como metabolismo, proliferación, diferenciación, adhesión, apoptosis y supervivencia, así como los procesos anormales, como la transformación, el bloqueo de la diferenciación y metástasis.

[0133] "Activo" o "actividad" para los fines aquí indicados se refiere a la forma(s) de un polipéptido IL-17A/F que mantiene una actividad biológica y/o inmunitaria de polipéptidos IL-17A/F nativos o de origen natural, en el que actividad "biológica" se refiere a una función biológica (ya sea inhibitoria o estimulante) causada por un polipéptido IL-17A/F nativo o de origen natural distinta de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un polipéptido IL-17A/F nativo o de origen natural y una actividad "inmunitaria" se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un polipéptido IL-17A/F nativo o de origen natural. Una actividad biológica preferida incluye inducir la activación de la NF- κ B y la estimulación de la producción de las quimioquinas proinflamatorias IL-8. Otra actividad biológica preferida incluye la estimulación de las células de sangre periférica mononuclear o células CD4⁺. Otra actividad biológica preferida incluye la estimulación de la proliferación de los linfocitos T. Otra actividad biológica preferida incluye, por ejemplo, la liberación de TNF- α a partir de células THP1. Una actividad alternativa es la reducción en la producción de IL-1 α inducida por NO (óxido nítrico) a partir del cartílago articular. Otra actividad que incluye una mejora de la síntesis de matriz en el cartílago articular. Como alternativa, otra de las actividades incluye la promoción de desglose de la matriz del cartílago articular, así como la inhibición de la síntesis de matriz. Otra actividad biológica preferida incluye una adaptación del nivel la vía de señalización de la interleuquina-17 durante las etapas de leve a severa de la enfermedad inflamatoria intestinal o durante un accidente cerebrovascular.

[0134] Una actividad "inmunitaria" sólo se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un polipéptido IL-17A/F nativo o de origen natural.

[0135] "Trastorno cartilaginoso degenerativo", describe una serie de trastornos que se caracterizan principalmente por la destrucción de la matriz del cartílago. Patologías adicionales incluye la producción de óxido nítrico, y elevada degradación de proteoglicanos. Trastornos ejemplares abarcados por esta definición, incluyen, por ejemplo, la artritis (por ejemplo, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica).

[0136] El término "enfermedad relacionada con el sistema inmunitario" indica una enfermedad en la que un componente del sistema inmunitario de un mamífero, media o contribuye de otro modo a la morbilidad en los mamíferos. También se incluyen las enfermedades en las que la estimulación o la intervención de la respuesta inmunitaria tiene un efecto paliativo sobre la progresión de la enfermedad. Incluido dentro de este término están enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmunitario, enfermedades inmunitarias no inflamatorias, enfermedades infecciosas, enfermedades de inmunodeficiencia, neoplasias, etc.

[0137] El término "enfermedad mediada por células T" significa una enfermedad en la que las células T, directa o indirectamente, median o contribuyen de otra manera a la morbilidad en un mamífero. La enfermedad mediada por células T puede ser asociada con efectos mediados por células, los efectos mediados por linfocinas, etc., e incluso los efectos asociados a las células B si las células B son estimuladas, por ejemplo, por las linfocinas secretadas por las células T.

[0138] Ejemplos de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario e inflamatorias, algunas de las cuales son mediadas por el sistema inmunitario o por células T, que pueden ser tratadas de acuerdo con la descripción incluyen el lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica progresiva (esclerodermia), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxística nocturna), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por el sistema inmunitario), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica de menores, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmunitario (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central y periférico, como la esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía crónica inflamatoria desmielinizante, enfermedad hepatobiliar como la hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus hepatotropos), hepatitis autoinmune crónica activa, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa y colangitis esclerosante, enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa: enfermedad de Crohn), enteropatía sensible al gluten y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunes o mediadas por el sistema inmunitario, incluidas las enfermedades de la piel ampollosas, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a los alimentos y urticaria, enfermedades inmunitarias del pulmón, tales como neumonías eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas al trasplante, tales como rechazo del injerto y enfermedad del injerto contra el huésped. Las enfermedades infecciosas, incluidas las enfermedades virales como el sida (VIH), hepatitis A, B, C, D y E, herpes, etc, infecciones bacterianas, infecciones por hongos, infecciones por protozoos e infecciones parasitarias. El término "cantidad efectiva" es una

concentración o cantidad de un polipéptido IL-17A/F y/o agonistas/antagonistas que resultan en el logro de un propósito establecido en particular. Una "cantidad efectiva" de un polipéptido IL-17A/F o agonistas o antagonistas del mismo puede ser determinada empíricamente. Además, una cantidad "terapéuticamente efectiva" es una concentración o cantidad de un polipéptido IL-17A/F y/o agonista/antagonista que es eficaz para lograr un efecto terapéutico indicado. Esta cantidad también puede ser determinada empíricamente.

[0139] El término "agente citotóxico" como se usa aquí se refiere a una sustancia que inhibe o impide el funcionamiento de las células y/o causa la destrucción de las células. El término propone incluir los isótopos radiactivos (*es decir*, ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y y ^{186}Re), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como las toxinas enzimáticamente activas de las bacterias, hongos, plantas, o de origen animal, o fragmentos de las mismas.

[0140] Un "agente de quimioterapia" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Algunos ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, citarabina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfano, citoxina, taxanos, *es decir*, paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncología, Princeton, NJ), y doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia), toxotere, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomycin, aminopterina, dactinomicina mitomicinas, esperamicinas (véase la patente US 4.675.187), melfalán y otros relacionados con las mostazas nitrogenadas. También se incluyen en esta definición agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores como el tamoxifeno y el onapristone.

[0141] Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, en especial de las células cancerosas que sobreexpresan cualquiera de los genes aquí identificados, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento es el que reduce significativamente el porcentaje de células que sobreexpresan genes de este tipo en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), como los agentes que inducen la detención G1 y la detención de fase M. Bloqueadores clásicos de fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxol, e inhibidores topo II, como la doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN como el tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Más información puede encontrarse en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami et al., (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente p. 13.

[0142] El término "citoquina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de las citoquinas son linfocinas, monocinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas entre las citoquinas hay hormonas de crecimiento como la hormona de crecimiento humano, hormona de crecimiento humana N-metionil y hormona de crecimiento bovino, hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteínas como la hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH), factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno de la placenta, factor de necrosis tumoral α y β -, sustancia inhibidora de Müller, péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina; trombopoyetina (TPO), factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- β , factor de crecimiento plaquetario, factores de crecimiento transformante (TGF), como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento a modo de insulina -I y -II; eritropoyetina (EPO), factores de osteoinductivos; interferones como interferón- α , β -, y γ -, factores estimulantes de colonias (CSFs), como los macrófagos-CSF (M-CSF); granulocitos-macrófagos-CSF (GM-CSF), y de granulocitos-CSF (G-CSF), interleuquinas (IL), tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, o IL-17, un factor de necrosis tumoral como TNF- α o TNF- β , y otros factores polipéptidos incluyendo LIF y equipo de ligando (KL). Como se usa aquí, el término citoquinas incluye a las proteínas a partir de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

Tabla 1

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int _day[26][26] = {
/*  A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
/* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
/* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
/* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
/* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
/* O */ {_M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, 0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
/* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS        1024    /* max jmps in an path */
#define MX          4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT         3      /* value of matching bases */
#define DMIS         0      /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0        8      /* penalty for a gap */
#define DINS1         1      /* penalty per base */
#define PINS0         8      /* penalty for a gap */
#define PINS1         4      /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP];    /* size of jmp (neg for del) */
    unsigned short x[MAXJMP];    /* base no. of jmp in seq x */
};

struct diag {
    int            score;        /* score at last jmp */
    long           offset;       /* offset of prev block */
    short          jmp;         /* current jmp index */
    struct jmp     jp;          /* list of jmps */
};

struct path {
    int            spc;          /* number of leading spaces */
    short          n[JMPS];      /* size of jmp (gap) */
    int            x[JMPS];      /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char              *ofile;        /* output file name */
char              *namex[2];     /* seq names: getseqs() */
char              *prog;         /* prog name for err msgs */
char              *seqx[2];      /* seqs: getseqs() */
int               dmax;          /* best diag: nw() */
int               dmax0;         /* final diag */
int               dna;           /* set if dna: main() */
int               endgaps;       /* set if penalizing end gaps */
int               gapx, gapy;     /* total gaps in seqs */
int               len0, len1;     /* seq lens */
int               ngapx, ngapy;   /* total size of gaps */
int               smax;          /* max score: nw() */
int               *xbm;          /* bitmap for matching */
long              offset;        /* current offset in jmp file */
struct diag       dx;            /* holds diagonals */
struct path       pp[2];         /* holds path for seqs */

char              *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char              *getseq(), *g_calloc();

```

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: prog file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static  _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static  _pbval[26] = {
    1, 2[(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A'))], 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25[(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))]
};

main(ac, av)                                main
{
    int      ac;
    char     *av[];

    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file 'align.out'\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0;                                /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";                        /* output file */

    nw();                                       /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps();                               /* get the actual jmps */
    print();                                  /* print stats, alignment */

    cleanup(0);                               /* unlink any tmp files */
}

```

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */

nw()
{
    char          *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int            *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int            ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int            *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
    int            mis;               /* score for each type */
    int            ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register       id;                /* diagonal index */
    register       ij;               /* jmp index */
    register       *col0, *col1;      /* score for curr, last row */
    register       xx, yy;            /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diag", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

nw

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongoing del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

    /* update penalty for del in y seq;
     * favor new del over ongoing del
     */
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else {
            delx -= ins1;
            ndelx++;
        }
    } else {
        if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
            ndelx++;
    }

    /* pick the maximum score; we're favoring
     * mis over any del and delx over dely
     */

```

...nw

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writeimps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
} else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writeimps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
    }
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (col1[yy] > smax) {
        smax = col1[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, {num}, seq, {num}): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE   256 /* maximum output line */
#define P_SPC    3    /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

print()
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(outfile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, outfile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

print

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
{
    int      lx, ly;                      /* "core" (minus endgaps) */
    int      firstgap, lastgap;           /* leading trailing overlap */

    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char      outx[32];
    double    pct;
    register  n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*((double)nm)/((double)lx);
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%d match%es in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base": "residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}

fprintf(fx, "\n gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}

if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1);

if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "\n<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base": "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base": "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "\n<endgaps not penalized\n");
}

static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];       /* jmp index for a path */
static      nc[2];       /* number at start of current line */
static      ni[2];       /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char *ps[2];      /* ptr to current element */
static char *po[2];      /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    int      nn;          /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(name[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

pr_align

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = ' ';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
         */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[i][i]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[i][i]++;
                while (ni[i] == pp[i].x[i][i])
                    siz[i] += pp[i].n[i][i]++;
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr_align

dumpblock

...dumpblock

```

(void) puts('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(pof[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
int ix; /* index in out[] holding seq line */
{
    char nline[P_LINE];
    register i, j;
    register char *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if ((i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j != 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) puts(*pn, fx);
    (void) puts('\n', fx);
}

```

nums

```

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int ix;
{

```

putline

...putline

```

int          i;
register char *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != '\n'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]); dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!(*out[0] || (*out[0] == '' && *(p0[0]) == '')) ||
        !(*out[1] || (*out[1] == '' && *(p0[1]) == '')))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

stars

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
char *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

```

stripname

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* tmp file for jumps */
FILE     *fj;

int      cleanup();                          /* cleanup tmp file */
long     lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
int      i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ':', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char     *
getseq(file, len)
char     *file;    /* file name */
int      *len;     /* seq len */
{
    char    line[1024], *pseq;
    register char    *px, *py;
    int      natgc, tlen;
    FILE     *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ':' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

```

cleanup

getseq

...getseq

```

py = pseq + 4;
*len = llen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (llen/3);
    return(pseq+4);
}

```

```

char *
g_calloc(msg, nx, sz)
char *msg;          /* program, calling routine */
int nx, sz;         /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

```

g_calloc

```

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */

```

```

readjmps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].jimp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;

```

readjmps

...readjumps

```

    if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ljump = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    if (siz < 0) { /* gap in second seq */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1 */
        /*
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
        */
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
else
    break;
}

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)
{
    int ix;
    char *mktemp();

    if (!f) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((f = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, f);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, f);
}

```

writejmps

Tabla 2

Proteína IL-17A/F	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 12 aminoácidos)

5 % de identidad en la secuencia de aminoácidos =

(el número de residuos de aminoácidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos de la proteína IL-17A/F) =

10

5 dividido por 15 = 33,3%

Tabla 3

Proteína IL-17A/F	XXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)

15 % de identidad en la secuencia de aminoácidos =

(el número de residuos de aminoácidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos de la proteína IL-17A/F) =

20

5 dividido por 10 = 50%

Tabla 4

ADN de IL-17A/F	NNNNNNNNNNNNNN	(Longitud = 14 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNNNLLLLLLLL	(Longitud = 16 nucleótidos)

% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos =

25

(el número de nucleótidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de ADN de IL-17A/F) =

30 6 dividido por 14 = 42,9%

Tabla 5

ADN de IL-17A/F
ADN de comparación

NNNNNNNNNNNN
NNNNLLLLVV

(Longitud = 12 nucleótidos)
(Longitud = 9 nucleótidos)

% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos =

(el número de nucleótidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de ADN de IL-17A/F) =

4 dividido por 12 = 33,3%

II. Composiciones y procedimientos

A. Polipéptidos IL-17A/F de longitud completa

[0143] La presente descripción proporciona secuencias de nucleótidos nuevamente identificadas y aisladas codificantes de polipéptidos a los que se hace referencia en la presente solicitud como polipéptidos IL-17A/F. En particular, se han identificado y aislado los ADNc codificantes de diversos polipéptidos IL-17A/F, tal como se da a conocer en más detalle en los Ejemplos, posteriormente.

B. Variantes de polipéptido IL-17A/F

[0144] Además de los polipéptidos IL-17A/F de secuencia nativa de longitud completa descritos en el presente documento, se contempla que puedan prepararse variantes de IL-17A/F. Las variantes de IL-17A/F pueden prepararse mediante la introducción de modificaciones apropiadas de nucleótidos en el ADN de IL-17A/F y/o mediante síntesis del polipéptido IL-17A/F deseado. Los expertos en la materia entenderán que las modificaciones de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales de IL-17A/F, por ejemplo la modificación del número o posición de los sitios de glucosilación o la alteración de las características de anclaje a membrana.

[0145] Pueden realizarse variaciones en el IL-17A/F de secuencia nativa de longitud completa o en diversos dominios de IL-17A/F descrito en el presente documento, por ejemplo utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas indicadas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos nº 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones codificantes del IL-17A/F que dan lugar a una modificación de la secuencia de aminoácidos del IL-17A/F comparado con el IL-17A/F de secuencia nativa. Opcionalmente la variación es mediante sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del IL-17A/F. Pueden encontrarse guías para determinar qué residuos de aminoácido pueden insertarse, sustituirse o eliminarse sin afectar adversamente la actividad deseada mediante la comparación de la secuencia del IL-17A/F con la de las moléculas de proteína homólogas conocidas y minimizando el número de modificaciones de la secuencia de aminoácidos realizadas en las regiones de homología elevada. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido por otro aminoácido que presente propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como la sustitución de una leucina por una serina, es decir sustituciones de aminoácidos conservativas. Las inserciones o delecciones opcionalmente pueden encontrarse comprendidas en el intervalo de entre aproximadamente 1 y 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse realizando sistemáticamente inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y sometiendo a ensayo las variantes resultantes para actividad mostrada por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

[0146] En el presente documento se proporcionan fragmentos de polipéptido IL-17A/F. Estos fragmentos pueden truncarse en el extremo N-terminal o C-terminal o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo en comparación con una proteína nativa de longitud completa. Determinados fragmentos no presentan residuos de aminoácidos que no resultan esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido IL-17A/F.

[0147] Pueden prepararse fragmentos de IL-17A/F mediante cualquiera de entre varias técnicas convencionales. Los fragmentos peptídicos deseados pueden sintetizarse químicamente. Una estrategia alternativa implica generar fragmentos de IL-17A/F mediante digestión enzimática, por ejemplo tratando la proteína con una enzima que es conocida por cortar proteínas en sitios definidos por residuos de aminoácido particulares, o mediante la digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando el fragmento deseado. Sin embargo, otra técnica adecuada implica aislar y amplificar un fragmento de ADN codificante de un fragmento polipeptídico deseado, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizan oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferentemente los fragmentos del polipéptido IL-17A/F comparten por lo menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido IL-17A/F nativo dado a conocer en el presente documento.

[0148] En realizaciones particulares, se muestran sustituciones conservativas de interés en la Tabla 6 bajo el título de sustituciones preferentes. Si estas sustituciones dan lugar a una modificación de la actividad biológica, se introducen

más modificaciones sustanciales, denominadas sustituciones de ejemplo en la Tabla 6 o tal como se describe adicionalmente después en referencia a las clases de aminoácido, y se criban los productos.

Tabla 6

Residuo original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferentes
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

5

[0149] Se realizan modificaciones sustanciales de la función o de la identidad inmunológica del polipéptido IL-17A/F mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de: (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo en conformación de lámina o de hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de las cadenas laterales:

10

- (1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílicos neutros: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen sobre la orientación de la cadena: gly, pro, y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

15

[0150] Las sustituciones no conservativas implican intercambiar un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Estos residuos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa o, más preferentemente, en los sitios (no conservados) restantes.

20

[0151] Las variaciones pueden realizarse utilizando procedimientos conocidos de la técnica, tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (sitio-dirigida), el rastreo de alaninas y la mutagénesis por PCR. La mutagénesis sitio-dirigida [Carter *et al.*, Nucl. Acids Res. 13:4331, 1986; Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res. 10:6487, 1987], la mutagénesis por inserción de casete [Wells *et al.*, Gene 34:315, 1985], la mutagénesis por restricción de selección [Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA 317:415, 1986] u otras técnicas conocidas pueden llevarse a cabo sobre el ADN clonado para producir el ADN de variante de IL-17A/F.

25

[0152] El análisis de rastreo de aminoácidos también puede utilizarse para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de rastreo preferentes se encuentran los aminoácidos neutros relativamente pequeños. Entre estos aminoácidos se incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es típicamente un aminoácido de rastreo preferente de entre este grupo debido a que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, Science 244:1081-1085, 1989]. La alanina también resulta típicamente preferente debido a que es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente en posiciones tanto enterradas como expuestas [Creighton, The Proteins, W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol. 150:1, 1976]. Si la sustitución de alaninas no proporciona cantidades adecuadas de variante, puede utilizarse un aminoácido isotérico.

35

40 C. Modificaciones de IL-17A/F

[0153] Las modificaciones covalentes de IL-17A/F se encuentran comprendidas dentro del alcance de la presente descripción. Un tipo de modificación covalente incluye reaccionar residuos de aminoácidos diana de un polipéptido IL-17A/F con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas de los

residuos N-terminales o C-terminales del IL-17A/F. La derivatización con agentes bifuncionales resulta útil, por ejemplo, para reticular IL-17A/F con una matriz de soporte o superficie insoluble en agua para la utilización en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-IL-17A/F, y viceversa. Entre los agentes reticulantes utilizados comúnmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidilo, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

[0154] Entre otras modificaciones se incluyen la desamidación de los residuos glutaminilo y asparaginilo en los residuos glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, la metilación de los grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79 a 86, 1983], la acetilación de la amina N-terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

[0155] Otro tipo de modificación covalente del polipéptido IL-17A/F comprendido dentro del alcance del presente documento comprende alterar el patrón de glucosilación nativo del polipéptido. La expresión "alterar el patrón de glucosilación nativo" pretende, para los fines del presente documento, referirse a la delección de uno o más grupos carbohidrato que se encuentran en el IL-17A/F de secuencia nativa (eliminando el sitio de glucosilación subyacente o eliminando la glucosilación por medios químicos y/o enzimáticos) y/o la adición de uno o más sitios de glucosilación que no se encuentran presentes en el IL-17A/F de secuencia nativa. Además, la expresión incluye modificaciones cualitativas en la glucosilación de las proteínas nativas, implicando una modificación de la naturaleza y proporciones de los diversos grupos carbohidrato presentes.

[0156] La adición de sitios de glucosilación en el polipéptido IL-17A/F puede conseguirse mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos. La alteración puede realizarse, por ejemplo, mediante la adición de uno o más residuos serina o treonina o la sustitución de los mismos en la IL-17A/F de secuencia nativa (para los sitios de glucosilación O-ligados). La secuencia de aminoácidos de IL-17A/F opcionalmente puede alterarse mediante cambios a nivel del ADN, particularmente mutando el ADN codificante del polipéptido IL-17A/F en bases preseleccionadas de manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

[0157] Otro medio para incrementar el número de grupos carbohidrato en el polipéptido IL-17A/F es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido. Estos procedimientos se describen en la técnica, por ejemplo en WO 87/05330, publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, páginas 259 a 306, 1981.

[0158] La eliminación de los grupos carbohidrato presentes en el polipéptido IL-17A/F puede conseguirse química o enzimáticamente o mediante la sustitución mutacional de codones codificantes de residuos de aminoácidos que sirven como dianas para la glucosilación. Las técnicas de desglucosilación química son conocidas de la técnica y se describen, por ejemplo, en Hakimuddin *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52, 1987, y en Edge *et al.*, *Anal. Biochem.* 118:131, 1981. El corte enzimático de los grupos carbohidrato en los polipéptidos puede conseguirse mediante la utilización de una diversidad de endoglucosidasas y exoglucosidasas tal como describen Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.* 138:350, 1987.

[0159] Otro tipo de modificación covalente de IL-17A/F comprende unir el polipéptido IL-17A/F a uno de entre una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera indicada en las patentes de Estados Unidos 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 o 4.179.337.

[0160] El IL-17A/F de la presente descripción también puede modificarse de manera que forme una molécula quimérica que comprende IL-17A/F fusionado con otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heteróloga.

[0161] En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión de IL-17A/F con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítipo etiqueta generalmente se sitúa en el extremo amino terminal o carboxi terminal del IL-17A/F. La presencia de estas formas etiquetadas con epítipo del IL-17A/F puede detectarse utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la provisión del epítipo etiqueta permite que IL-17A/F se purifique con facilidad mediante purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se una al epítipo etiqueta. Son bien conocidos de la técnica diversos polipéptidos etiqueta y sus anticuerpos respectivos. Entre los ejemplos se incluyen etiquetas polihistidina (poli-his) o polihistidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 8:2159-2165, 1988], la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 del mismo [Evan *et al.*, *Molecular and Cellular Biology* 5:3610-3616, 1985] y la etiqueta glucoproteína D (gD) del virus del herpes simplex y su anticuerpos [Paborsky *et al.*, *Protein Engineering* 3(6):547-553, 1990]. Entre otros polipéptidos etiqueta se incluyen el péptido Flag [Hopp *et al.*, *BioTechnology* 6:1204-1210, 1988], el péptido epítipo KT3 [Martin *et al.*, *Science* 255:192-194, 1992], un péptido epítipo alfa-tubulina [Skinner *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266:15163-15166, 1991] y el péptido etiqueta de la proteína del gen 10 de T7 [Lutz-Freyermuth *et al.*, *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 87:6393-6397, 1990].

[0162] En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión de IL-17A/F con una inmunoglobulina o con una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también denominada "inmunoadhesina"), dicha fusión podría ser con la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig preferentemente incluyen la sustitución de una forma soluble (con delección o inactivación del dominio transmembrana) de un polipéptido IL-17A/F en lugar de por lo menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferente, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra de regiones CH2 y CH3, o la bisagra de regiones CH1, CH2 y CH3 d una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina ver también la patente US nº 5.428.130, publicada el 27 de junio de 1995.

[0163] En una realización adicional, los polipéptidos IL-17A/F de la presente descripción también se puede modificar de una manera que modifica una molécula quimérica que comprende un polipéptido IL-17A/F fusionado a un cremallera de leucinas. Se han descrito en la técnica varios polipéptidos de cremalleras de leucina. Véase, por ejemplo, Landschulz et al., Science, 240:1759 (1988); WO94/10308; Hoppe et al., FEBS Letters, 344:1991 (1994); Maniatis et al., Nature, 341:24 (1989). Se cree que la utilización de una cremallera de leucinas fusionada a un polipéptido IL-17A/F puede ser deseable para ayudar en la dimerización o trimerización del polipéptido IL-17A/F soluble en solución. Los expertos en la materia entenderán que la cremallera de leucinas se puede fusionar al extremo N o C-terminal de la molécula de IL-17A/F.

D. Preparación de IL-17A/F

[0164] La descripción posterior se refiere principalmente a la producción de IL-17A/F mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico de IL-17A/F. Evidentemente se contempla que puedan utilizarse procedimientos alternativos, que son bien conocidos de la técnica, para preparar IL-17A/F. Por ejemplo, la secuencia de IL-17A/F, o partes de la misma, pueden producirse mediante síntesis directa del péptido utilizando técnicas de fase sólida [ver, por ejemplo, Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA, 1969; Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154, 1963]. La síntesis de proteínas *in vitro* puede llevarse a cabo utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada puede conseguirse, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Pueden sintetizarse químicamente diversas partes de IL-17A/F separadamente y combinarse utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el IL-17A/F de longitud completa.

1. Aislamiento del ADN que codifica IL-17A/F

[0165] El ADN que codifica IL-17A/F se puede obtener a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm de IL-17A/F y lo expresa a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN de IL-17A/F humano se puede obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano, tal como se describe en los ejemplos. El gen que codifica IL-17A/F también se puede obtener a partir de una biblioteca genómica o mediante métodos de síntesis conocidos (por ejemplo, síntesis de ácidos nucleicos automatizada).

[0166] Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como anticuerpos para IL-17A/F u oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20-80 bases) diseñados para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado del ADNc o biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede realizar utilizando procedimientos estándar, tal como se describe en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica IL-17A/F es utilizar la metodología de PCR [Sambrook et al., *supra*; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

[0167] Los ejemplos siguientes describen técnicas para cribar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían ser de longitud suficiente y suficientemente inequívoca que se minimizan los falsos positivos. El oligonucleótido está preferiblemente marcado de manera que se puede detectar tras la hibridación a ADN en la biblioteca que se criba. Los procedimientos de marcado son bien conocidos en la técnica, e incluyen la utilización de radiomarcadores como ATP marcado con P, biotilación o marcaje enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la astringencia moderada y la astringencia elevada, se proporcionan en Sambrook et al., *supra*.

[0168] Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas se pueden comparar y alinear con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicos, tales como el Banco de Genes u otras bases de datos privadas de secuencias. La identidad de secuencia (a nivel de aminoácido o nucleótido) en las regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa se puede determinar utilizando procedimientos conocidos en la técnica y tal y como se describen aquí.

[0169] El ácido nucleico que tiene la secuencia de codificación de la proteína se puede obtener mediante el cribado del ADNc seleccionado o las bibliotecas genómicas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida descrita aquí por

primera vez, y, si es necesario, utilizando procedimientos convencionales de extensión con cebadores tal y como se describe en Sambrook et al., *supra*, para detectar precursores y procesando intermedios de ARNm que no se han transcrito de forma inversa en ADNc.

5 2. Selección y transformación de células huésped

[0170] Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación aquí descritos para la producción de IL-17A/F y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados para que sean adecuados para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, se pueden seleccionar por un experto en la materia sin una experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook et al., *supra*.

[0171] Los procedimientos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariotas son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, CaCl_2 , CaPO_4 , mediados por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar adecuadas a dichas células. El tratamiento con calcio que utiliza cloruro cálcico, tal y como se describe en Sambrook et al., *supra*, o la electroporación se utilizan generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, tal como describe Shaw et al., Gene, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede utilizar el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978). En la Patente de Estados Unidos No. 4.399.216 se han descrito aspectos generales de transfecciones de sistemas de células huésped de mamíferos. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo habitualmente según el procedimiento de Van Solingen et al., J. Bact., 130: 946 (1977) y Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden utilizar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policonaciones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para varias técnicas para transformar células de mamífero, ver Keown et al., Methods in enzymology, 185:527-537 (1990) y Manssur et al., Nature, 336. 348-352 (1988).

[0172] Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores del presente documento se incluyen células procariotas, levadura, o eucariotas superiores. Entre las procariotas adecuadas se incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, Enterobacteriaceae, tal como *E. Coli*. Varias cepas de *E. Coli* están disponibles públicamente, tales como la cepa de *E. Coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. Coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa de *E. Coli* W3110 (ATCC 27.325) y cepa de *E. Coli* K5772 (ATCC 53.635). Entre otras células huésped procariotas adecuadas se incluyen Enterobacteriaceae, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. Coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes. La Cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferible ya que es una cepa de huésped habitual para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para realizar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al huésped, con ejemplos de dichos huéspedes incluyendo la cepa de *E. Coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; la cepa de *E. Coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; la cepa de *E. Coli* W3110 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r*; la cepa de *E. Coli* W3110 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; la cepa de *E. Coli* W3110 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación de eliminación *degP* no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. Coli* que tiene proteasa periplásmica mutante descrita en la Patente de Estados Unidos No. 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de ácido nucleico polimerasa.

[0173] Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican IL-17A/F. El *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior utilizado habitualmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139.383 publicada el 2 de mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (Patente de Estados Unidos No. 4.943.529; Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS574; Louvencourt et al. J. Bacteriol., 737 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135(1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna et al., J. Basic. Microbiol. 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma recai* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538, publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 publicada el 10 de enero de 1991); y huéspedes *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983];

Tilburn et al., Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. Niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Las levaduras metilotrópicas son adecuadas en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, levadura capaz del crecimiento en metanol seleccionada del género que consiste en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplos de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, The Biochemistry of Methylophs, 269 (1982).

[0174] Las células huésped adecuadas para la expresión de IL-17A/F glucosilado se derivan a partir de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrado se incluyen células de insecto, tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9 o células High5 de *Spodoptera*, así como células vegetales. Entre los ejemplos de líneas celulares de huéspedes mamíferos que resultan útiles se incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) y las células COS. Entre los ejemplos más específicos se incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC n° CRL 1651), la línea renal embrionaria humana (células 293 ó 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59, 1977), las células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980), las células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251, 1980, las células pulmonares humanas (W138, ATCC n° CCL 75), las células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065) y el tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC n° CCL51). La selección de la célula huésped apropiada se considera que se encuentra comprendida dentro de los conocimientos del experto en la materia.

3. Selección y utilización de un vector replicable

[0175] El ácido nucleico (por ejemplo ADNc o ADN genómico) codificante de IL-17A/F puede insertarse en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Se encuentran disponibles públicamente diversos vectores. El vector puede encontrarse, por ejemplo, en la forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiado puede insertarse en el vector mediante una diversidad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en uno o más sitios de restricción de endonucleasa apropiados utilizando procedimientos conocidos de la técnica. Entre los componentes de vector se incluyen de manera general, aunque sin limitarse a ellos, uno o más de entre: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes utiliza técnicas estándares de ligación que son conocidas por el experto en la materia.

[0176] El IL-17A/F puede producirse recombinantemente no sólo de manera directa, sino también en forma de un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia de señal u otro polipéptido que presente un sitio de corte específico en el extremo N-terminal de la proteína madura o del polipéptido. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN codificante de IL-17A/F que se inserta en el vector. La secuencia de señal puede ser una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, de entre el grupo que la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o líderes de enterotoxina II termoestable. Para la secreción en levaduras, la secuencia de señal puede ser, por ejemplo, el líder invertasa de levadura, el líder de factor alfa (incluyendo los líderes de factor α de *Saccharomyces* y de *Kluyveromyces*, éste último descrito en la patente US n° 5.010.182) o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (patente EP n° 362.179, publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en la patente WO n° 90/13646, publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión en células de mamífero, pueden utilizarse secuencias de señal de mamífero para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias de señal de polipéptidos secretados de la misma especie o de una especie relacionada, así como secuencias líderes secretoras víricas.

[0177] Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Estas secuencias son bien conocidas para una diversidad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 resulta adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2 μ resulta adecuado para las levaduras y los diversos orígenes víricos (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) resultan útiles para vectores de clonación en células de mamífero.

[0178] Los vectores de expresión y de clonación típicamente contienen un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que: (a) proporcionan resistencia frente a antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, por ejemplo el gen codificante de la D-alanina racemasa para los bacilos.

[0179] Son ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para las células de mamífero aquellos que permiten la identificación de las células competentes para la incorporación del ácido nucleico codificante de IL-17A/F, tales como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada en el caso de que se utilice DHFR de tipo salvaje es la línea celular CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada tal como describen Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980. Un gen de selección adecuado para la utilización en levaduras es el gen trp1 presentes en el plásmido levadura YRp7 [Stinchcomb et al., Nature 282:39, 1979; Kingsman et al., Gene 7:141, 1979;

Tschemper *et al.*, Gene 10:157, 1980]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura sin la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo la ATCC n° 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics 85:12, 1977].

[0180] Los vectores de expresión o de clonación habitualmente contienen un promotor operablemente ligado a la secuencia de ácidos nucleicos codificante de IL-17A/F para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por una diversidad de células huésped potenciales son bien conocidos. Entre los promotores adecuados para la utilización con huéspedes procarióticos se incluyen los sistemas de promotor β -lactamasa y lactosa [Chang *et al.*, Nature 275:615, 1978; Goeddel *et al.*, Nature 281:544, 1979], fosfatasa alcalina, un sistema promotor triptófano (*trp*), Goeddel, Nucleic Acids Res. 8:4057, 1980; patente EP n° 36.776] y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* [deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25, 1983]. Los promotores para la utilización en sistemas bacterianos también contienen una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente unida al ADN codificante de IL-17A/F.

[0181] Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para la utilización con huéspedes levaduras se incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem. 255:2073, 1980] u otros enzimas glucolíticos [Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg. 7:149, 1968; Holland, Biochemistry 17:4900, 1978], tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, tiosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

[0182] Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que presentan la ventaja adicional de que la transcripción está controlada por las condiciones de cultivo, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, los enzimas degradativos asociados con el metabolismo del nitrógeno, la metalotioneína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y los enzimas responsables de la utilización de la maltosa y de la galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en la patente EP n° 73.657.

[0183] La transcripción de IL-17A/F a partir de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del polio, el virus de la viruela aviar (patente UK n° 2.211.054, publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, retrovirus, el virus de la hepatitis B y el virus 40 del simio (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo el promotor actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, con la condición de que estos promotores resulten compatibles con los sistemas de células huésped.

[0184] La transcripción de un ADN codificante de IL-17A/F por eucariotas superiores puede incrementarse mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, habitualmente de entre 10 y 300 pb, que actúan sobre un promotor incrementando la transcripción del mismo. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Sin embargo, típicamente se utiliza un potenciador procedente de un virus de célula eucariótica. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100 a 270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador del polio en el lado tardío del origen de replicación e potenciadores de adenovirus. El potenciador puede introducirse en el vector en una posición 5' o 3' respecto a la secuencia codificante de IL-17A/F, aunque preferentemente se sitúa en un sitio 5' respecto al promotor.

[0185] Los vectores de expresión utilizados en las células huésped procarióticas (levaduras, hongos, células de insecto, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contienen secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Estas secuencias se encuentran comúnmente disponibles en las regiones 5', y ocasionalmente 3', no traducidas procedentes de ADNs o ADNcs eucarióticos o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm codificante de IL-17A/F.

[0186] Otros procedimientos, vectores y células huésped adecuadas para la adaptación a la síntesis de IL-17A/F en cultivo celular recombinante de vertebrados se describen en Gething *et al.*, Nature 293:620-625, 1981; Mantei *et al.*, Nature 281:40-46, 1979; patentes EP n° 117.060 y n° 117.058.

4. Detección de la amplificación/expresión génicas

[0187] La amplificación y/o expresión génicas pueden medirse en una muestra directamente, por ejemplo mediante transferencia southern, transferencia northern convencional para cuantificar la transcripción del ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205, 1980], transferencia por puntos (análisis de ADN) o hibridación *in situ*, utilizando una sonda apropiadamente marcada basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Alternativamente, pueden utilizarse anticuerpos que pueden reconocer dobles cadenas específicas, incluyendo dobles cadenas de ADN, dobles cadenas de ARN y dobles cadenas híbridas ADN-ARN o dobles cadenas ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez pueden marcarse y el ensayo puede llevarse a cabo donde la doble cadena se encuentra unida

a una superficie, de manera que tras la formación de la doble cadena sobre la superficie, pueda detectarse la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

[0188] La expresión génica alternativamente puede medirse mediante procedimientos inmunológicos, tales como la tinción inmunohistoquímica de células o de secciones de tejido y el ensayo de cultivo celular o de líquidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de líquidos de muestra puede ser monoclonal o policlonal, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido IL-17A/F de secuencia nativa o contra un péptido sintético basándose en las secuencias de ADN proporcionadas en el presente documento o contra una secuencia exógena fusionada con ADN de IL-17A/F y codificante de un epítipo de anticuerpo específico.

5. Purificación de polipéptido

[0189] Pueden recuperarse formas de IL-17A/F a partir de medio de cultivo o de lisados de células huésped. Si se encuentran unidas a membrana, pueden liberarse de la membrana utilizando una solución detergente adecuada (por ejemplo Triton-X 100) o mediante corte enzimático. Las células utilizadas en la expresión de IL-17A/F pueden romperse mediante diversos medios físicos o químicos, tales como el ciclo de congelación-descongelación, la sonicación, la rotura mecánica o agentes de lisado celular.

[0190] Puede desearse purificar IL-17A/F a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los procedimientos siguientes son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; la precipitación con etanol; la HPLC de fase inversa; la cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; el cromatoforé; SDS-PAGE; la precipitación con sulfato amónico; la filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A-sefara para eliminar contaminantes tales como IgG; y columnas quelantes de metales para ligar formas de IL-17A/F etiquetadas con epítipo. Pueden utilizarse diversos procedimientos de purificación de proteínas y estos procedimientos son conocidos de la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology* 182, 1990; Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York, 1982. La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y del IL-17A/F particular producido.

E. Usos para IL-17A/F

[0191] Las secuencias de nucleótidos (o su complemento) que codifican IL-17A/F tienen varias aplicaciones en el sector de la biología molecular, incluyendo usos como sondas de hibridación, en mapeo cromosómico y génico y en la generación de ARN y ADN anti-sentido. El ácido nucleico que codifica IL-17A/F también será útil para la preparación de polipéptidos IL-17A/F mediante las técnicas recombinantes descritas en el presente documento.

[0192] El gen de IL-17A/F de secuencia nativa y longitud completa, o partes del mismo, puede utilizarse como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar el ADNc de IL-17A/F de longitud completa o para aislar otros ADNcs (por ejemplo, los que codifican variantes naturales de IL-17A/F o IL-17A/F de otras especies) que tienen una identidad de secuencia deseada con la secuencia de IL-17A/F nativa descrita en el presente documento. Opcionalmente, la longitud de las sondas será de aproximadamente 20 hasta aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación pueden derivarse de regiones por lo menos parcialmente nuevas de la secuencia de nucleótidos nativa de longitud completa en las que se pueden determinar estas regiones sin demasiada experimentación o a partir de secuencias genómicas que incluyen promotores, elementos potenciadores e intrones de IL-17A/F de secuencia nativa. A modo de ejemplo, un procedimiento de cribado comprenderá el aislamiento de la región codificante del gen de IL-17A/F utilizando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases. Las sondas de hibridación pueden marcarse mediante una serie de marcadores, incluyendo radionucleótidos como el ³²P o ¹⁵S, o marcadores enzimáticos tales como la fosfatasa alcalina acoplada a la sonda mediante sistemas de acoplamiento de avidina/biotina. Las sondas marcadas que tienen una secuencia complementaria con aquellas del gen de IL-17A/F de la presente descripción se pueden utilizar para cribar bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico o ARNm para determinar a qué miembros de dichas bibliotecas se hibrida la sonda. En los Ejemplos de más adelante se describen técnicas de hibridación con mayor detalle.

[0193] Cualquiera de las secuencias EST descritas en la presente solicitud pueden emplearse de forma similar como sondas, utilizando los procedimientos descritos en el presente documento.

[0194] Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos que codifican IL-17A/F incluyen oligonucleótidos antisentido (no codificante) o sentido (codificante) que comprenden una secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla (ya sea ARN o ADN) capaz de unirse a las secuencias de ARNm de IL-17A/F diana (sentido) o de ADN de IL-17A/F (antisentido). Los oligonucleótidos antisentido o sentido, según la presente descripción, comprenden un fragmento de la región que codifica del ADN de IL-17A/F. Dicho fragmento generalmente comprende por lo menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente desde aproximadamente 14 hasta 30 nucleótidos. La capacidad de derivar un oligonucleótido antisentido o de sentido, en base a una secuencia de ADNc que codifica una proteína determinada se

describe en, por ejemplo, Stein y Cohen (Cancer Res, 48:2659,1988) y van der Krol et al. (BioTechniques 6:958, 1988).

[0195] La unión de oligonucleótidos antisentido o de sentido a las secuencias de ácido nucleico diana da lugar a la formación de cadenas dobles que bloquean la transcripción o la traducción de la secuencia diana mediante uno de varios medios, incluyendo la mayor degradación de las cadenas dobles, la finalización prematura de la transcripción o la traducción, o por otros medios. De este modo, los oligonucleótidos antisentido pueden utilizarse para bloquear la expresión de las proteínas IL-17A/F. Los oligonucleótidos antisentido o de sentido comprenden además oligonucleótidos que tienen esqueletos de azúcar-fosfodiéster modificados (u otros enlaces de azúcar, como los descritos en WO 91/06629) y en los cuales dichos enlaces de azúcar son resistentes a nucleasas endógenas. Dichos oligonucleótidos con enlaces de azúcar resistentes son estables *in vivo* (es decir, son capaces de resistir la degradación enzimática), pero mantienen la especificidad de secuencia para ser capaz de unirse a las secuencias de nucleótidos diana. Otros ejemplos de oligonucleótidos sentido o antisentido incluyen aquellos oligonucleótidos que se unen covalentemente a grupos orgánicos, tales como los descritos en WO 90/10048, y otros grupos que incrementan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácido nucleico diana, como por ejemplo poli-(L-lisina). Además, pueden unirse agentes intercalantes, tales como la elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos a los oligonucleótidos sentido o antisentido para modificar especificidades de unión del oligonucleótido antisentido o sentido por la secuencia de nucleótidos diana.

[0196] Pueden introducirse oligonucleótidos sentido o antisentido dentro de una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana mediante cualquier método de transferencia de genes, incluyendo, por ejemplo, transfección de ADN mediada por CaPO_4 , electroporación, o mediante el uso de vectores de transferencia de genes, tales como el virus Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, se inserta un oligonucleótido antisentido o sentido dentro de un vector retroviral adecuado. Se pone en contacto una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana con el vector retroviral recombinante, ya sea *in vivo* o *ex vivo*. Los vectores retrovirales adecuados incluyen, pero sin limitación, aquellos derivados del retrovirus murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV), o los vectores de copia doble denominados DCT5A, DCT5B y DCT5C (ver WO 90/13641).

[0197] También pueden introducirse oligonucleótidos sentido o antisentido dentro de una célula que contiene la secuencia de nucleótidos diana mediante la formación de un conjugado con una molécula de unión a ligando, tal y como se describe en WO 91/04753. Las moléculas de unión a ligando incluyen, pero sin limitación, receptores de superficie celular, factores de crecimiento, otras citocinas, u otros ligandos que se unen a receptores de la superficie celular. Preferentemente, la conjugación de la molécula de unión a ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de unión a ligando de unirse a su molécula o receptor correspondiente, o de bloquear la entrada de oligonucleótido sentido o antisentido o su versión conjugada dentro de la célula.

[0198] De modo alternativo, un oligonucleótido sentido o antisentido puede introducirse dentro de una célula que contenga la secuencia de ácido nucleico diana mediante la formación de un complejo oligonucleótido-lípido, tal y como se describe en WO 90/10448. Preferentemente el complejo oligonucleótido sentido o antisentido-lípido se disocia dentro de la célula por una lipasa endógena.

[0199] Las moléculas de ARN o ADN antisentido o sentido tienen generalmente por lo menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, de modo alternativo por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, o 1000 nucleótidos de longitud, donde en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de secuencia de nucleótidos referida más o menos un 10% de la longitud de referencia.

[0200] Las sondas también pueden emplearse en técnicas de PCR para generar un grupo de secuencias para la identificación de secuencias que codifican IL-17A/F estrechamente relacionadas.

[0201] También pueden utilizarse secuencias de nucleótidos que codifican IL-17A/F para construir sondas de hibridación para localizar el gen que codifica esa IL-17A/F y para el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en el presente documento pueden localizarse en un cromosoma y en regiones específicas de un cromosoma utilizando técnicas conocidas, como por ejemplo la hibridación *in situ*, análisis de unión contra marcadores cromosómicos conocidos, y el cribado por hibridación con bibliotecas.

[0202] Cuando las secuencias que codifican para IL-17-A/F codifican una proteína que se une a otra proteína (por ejemplo, cuando la proteína es un receptor), puede utilizarse la proteína en ensayos para identificar las otras proteínas o moléculas implicadas en la interacción de la unión. Mediante dichos procedimientos, pueden identificarse inhibidores de la interacción de la unión receptor/ligando. También pueden utilizarse proteínas implicadas en dichas interacciones de unión para cribar inhibidores o agonistas de péptidos o moléculas pequeñas de la interacción de unión. Además, puede utilizarse la proteína receptora para aislar un ligando o ligandos correlativos. Pueden diseñarse ensayos de

cribado para hallar compuestos principales que mimetizan la actividad biológica de una IL-17-A/F nativa o un receptor para IL-17-A/F. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciendo que sean especialmente adecuados para identificar candidatos de fármacos de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos sintéticos orgánicos o inorgánicos. Pueden realizarse los ensayos en una serie de formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en el sector.

[0203] También pueden utilizarse ácidos nucleicos que codifican IL-17-A/F o sus formas modificadas para generar animales transgénicos no humanos o animales "knock out" no humanos que, a su vez, son útiles en el desarrollo y el cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, el cual se introdujo en el animal o en un progenitor del animal en una fase prenatal, por ejemplo, embrionaria. Un transgén es un ADN que está integrado dentro del genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico. En una realización, puede utilizarse el ADNc que codifica IL-17-A/F para clonar el ADN genómico que codifica IL-17-A/F de acuerdo con las técnicas establecidas y las secuencias genómicas utilizadas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN que codifica IL-17-A/F. Los procedimientos para la generación de animales transgénicos, en concreto animales tales como ratones o ratas, se han convertido en convencionales en el sector y están descritos, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 4,736,866 y 4,870,009. Habitualmente, las células concretas serían marcadas para la incorporación de transgén de IL-17-A/F con potenciadores específicos de tejido. Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica IL-17-A/F introducida en la línea germinal del animal en una fase embrionaria pueden utilizarse para examinar el efecto de la expresión incrementada de ADN que codifica IL-17-A/F. Pueden utilizarse dichos animales como animales de muestra para reactivos pensados para proporcionar protección frente a, por ejemplo, estados patológicos asociados con su sobreexpresión. Según esto, se trata a un animal con el reactivo y una incidencia reducida del estado patológico, en comparación con los animales no tratados que llevan el transgén, indicaría una intervención terapéutica potencial para el estado patológico.

[0204] De modo alternativo, pueden utilizarse homólogos de IL-17-A/F no humanos para construir un animal "knock out" con IL-17-A/F que tiene un gen defectuoso o alterado que codifica IL-17-A/F como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica IL-17-A/F y el ADN genómico alterado que codifica IL-17-A/F introducido en una célula madre embrionaria del animal. Por ejemplo, puede utilizarse el ADNc que codifica IL-17-A/F para clonar ADN genómico que codifica IL-17-A/F de acuerdo con las técnicas establecidas. Puede suprimirse una parte del ADN genómico que codifica IL-17-A/F o sustituirse por otro gen, como por ejemplo un gen que codifica un marcador seleccionable que puede utilizarse para monitorizar la integración. Habitualmente, se incluyen diversas kilobases del ADN flanqueante no alterado (en los extremos 5' y 3') en el vector [ver por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell, 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homóloga]. Se introduce el vector en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan células en las que el ADN introducido se ha recombinado homológamente con ADN endógeno [ver por ejemplo, Li et al., Cell, 69:915 (1992)]. A continuación se inyectan las células seleccionadas en un blastocisto de un animal (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación [ver por ejemplo, Bradley, en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), págs. 113-152]. A continuación, puede implantarse un embrión quimérico en un animal de acogida hembra pseudopreñado y se hace nacer el embrión para crear un animal "knock out". Puede identificarse la progenie que alberga el ADN homológamente recombinado en sus células germinales mediante técnicas estándar y utilizarse para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN homológamente recombinado. Pueden caracterizarse animales knockout por ejemplo, por su capacidad de defenderse contra ciertos estados patológicos y por su desarrollo en estados patológicos debido a la ausencia del polipéptido IL-17-A/F.

[0205] También puede utilizarse el ácido nucleico que codifica los polipéptidos IL-17A/F en terapia génica. En aplicaciones de terapia génica, se introducen genes en células con el objetivo de lograr la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo para el reemplazo de un gen defectuoso. La "terapia génica" incluye tanto terapia génica convencional en la que se logra un efecto duradero mediante un único tratamiento, como la administración de agentes terapéuticos génicos, lo cual implica la administración de una vez o repetida de un ADN o ARNm terapéuticamente eficaz. Pueden utilizarse ARNs y ADNs antisentido como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes *in vivo*. Se ha observado que los oligonucleótidos cortos antisentido pueden importarse en células en las que actúan como inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares causadas por su captación limitada por parte de la membrana celular. (Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986]). Pueden modificarse los oligonucleótidos para potenciar su captación, por ejemplo mediante la sustitución de sus grupos fosfodiéster cargados negativamente por grupos no cargados.

[0206] Existe una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si se transfiere el ácido nucleico en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del huésped previsto. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico, etc. Las técnicas de transferencia de genes *in vivo* preferentes en la actualidad incluyen la transfección con vectores virales (habitualmente retrovirales) y la transfección mediada por proteína-

liposoma de la cubierta viral (Dzau et al., Trends in Biotechnology 11, 205-210 [1993]). En algunas situaciones es deseable proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente que reconoce las células diana, como por ejemplo un anticuerpo específico para una proteína de membrana de la superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se emplean liposomas, pueden utilizarse proteínas que se unen a una proteína de membrana de la superficie celular asociada con la endocitosis para el reconocimiento y/o para facilitar la captación, por ejemplo, proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas tropicas para un tipo de célula concreto, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en el ciclado, proteínas que dirigen la localización intracelular y aumentan la vida media intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor está descrita, por ejemplo, por Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987); y Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos de marcaje génico y terapia génica, véase Anderson et al., Science 256, 808-813 (1992).

[0207] Los polipéptidos IL-17A/F aquí descritos también se pueden utilizar como marcadores de peso molecular para fines de electroforesis para proteínas y las secuencias de ácido nucleico aisladas se pueden utilizar para la expresión recombinante de estos marcadores.

[0208] Las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos IL-17A/F o fragmentos de los mismos descritos en la presente descripción son útiles para la identificación del cromosoma. En este aspecto, existe una necesidad actual de identificar nuevos marcadores cromosómicos, ya que actualmente hay disponibles relativamente pocos reactivos de marcaje cromosómico. Puede utilizarse cada molécula de ácido nucleico de IL-17A/F de la presente descripción como un marcador cromosómico.

[0209] También pueden utilizarse de modo diagnóstico los polipéptidos IL-17A/F y las moléculas de ácido nucleico de la presente descripción para la tipificación de tejido, donde los polipéptidos IL-17A/F de la presente descripción pueden expresarse diferencialmente en un tejido en comparación con otro, preferiblemente en un tejido enfermo en comparación con un tejido normal del mismo tipo de tejido. Las moléculas de ácido nucleico de IL-17A/F serán útiles en la generación de sondas para PCR, análisis Northern, análisis Southern y análisis Western.

[0210] Los polipéptidos IL-17A/F aquí descritos también se pueden utilizar como agentes terapéuticos. Los polipéptidos IL-17A/F de la presente descripción se pueden formular según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mediante las cuales el producto IL-17A/F de las mismas se combina con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones terapéuticas se preparan para su almacenamiento mediante la mezcla del principio activo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª Edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcares, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o PEG.

[0211] Las formulaciones a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución.

[0212] Las composiciones terapéuticas del presente documento se colocan generalmente en un recipiente con un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial con un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

[0213] La vía de administración está de acuerdo con los procedimientos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, administración tópica, o por sistemas de liberación controlada.

[0214] Las dosis y las concentraciones del fármaco deseadas de composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden variar dependiendo del uso particular previsto. La determinación de la dosis apropiada o vía de administración está dentro de la capacidad de un médico ordinario. Los experimentos en animales proporcionan una orientación fiable para la determinación de las dosis eficaces para la terapia humana. El escalado entre especies de dosis eficaces se puede realizar siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Eds., Pergamon Press, New York 1989, pág. 42-96.

[0215] Cuando se emplea la administración *in vivo* de un polipéptido IL-17A/F o agonistas o antagonistas del mismo, las cantidades de dosis normales pueden variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal del mamífero o más por día, preferiblemente aproximadamente de 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía

de administración. La orientación en cuanto a las dosis y procedimientos de liberación se proporciona en la literatura, véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N ° 4.657.760; 5.206.344 ó 5.225.212. Se prevé que diferentes formulaciones serán efectivas para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, que la administración dirigida a un órgano o tejido, por ejemplo, puede requerir la liberación de una manera diferente de la de otro órgano o tejido.

[0216] Cuando se desea la administración de liberación controlada de un polipéptido IL-17A/F en una formulación con características de liberación adecuadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que requiera la administración del polipéptido IL-17A/F, se contempla la microencapsulación del polipéptido modificado. La microencapsulación de proteínas recombinantes para la liberación controlada se ha realizado con éxito con la hormona de crecimiento humano (rhGH), interferón-(rhIFN-), interleucina-2, y MN rgp120. Johnson et al., Nat. Med., 2:795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Allf., 27:1221-1223 (1993); Hora et al., Bio/Technology, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach", Powell y Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399 y la patente de Estados Unidos 5.654.010.

[0217] Las formulaciones de liberación controlada de estas proteínas se desarrollaron usando el polímero de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y la amplia gama propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, ácidos láctico y glicólico, se pueden eliminar rápidamente en el cuerpo humano. Además, la degradabilidad de este polímero se puede ajustar desde meses a años dependiendo de su peso molecular y la composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," en: M. Chasin and R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: Nueva York, 1990), pág. 1-4.

[0218] La presente descripción comprende métodos de cribado de compuestos para identificar aquellos compuestos que mimetizan el polipéptido IL-17A/F (agonistas) o prevenir el efecto del polipéptido IL-17A/F (antagonistas). Los ensayos de cribado de fármacos candidatos antagonistas están diseñados para identificar compuestos que se unen o forman complejos con los polipéptidos IL-17A/F codificados por los genes identificados aquí, o de otro modo interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para la identificación de pequeñas moléculas como fármacos candidatos.

[0219] Los ensayos pueden realizarse en una variedad de formatos, incluyendo ensayos de unión de proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímicos, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

[0220] Todos los ensayos tienen en común que requieren el contacto del fármaco candidato con un polipéptido IL-17A/F codificado por un ácido nucleico aquí identificado en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen.

[0221] En ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido IL-17A/F codificado por el gen identificado aquí o el fármaco candidato se inmovilizan sobre una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente generalmente se realiza mediante el recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido IL-17A/F y dejándolo secar. Alternativamente, puede utilizarse un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido IL-17A/F a ser inmovilizado para fijarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza añadiendo el componente no inmovilizado, que puede estar marcado con un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente fijado. Cuando la reacción se ha completado, se eliminan los componentes que no han reaccionado, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos fijados en la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado transporta un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que el complejo se ha formado. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no transporta un marcador, se puede detectar la formación del complejo, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

[0222] Si el compuesto candidato interactúa pero no se une a un polipéptido IL-17A/F particular codificado por un gen identificado aquí, su interacción con este polipéptido puede ser analizada mediante procedimientos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen estrategias tradicionales, tales como el entrecruzamiento, la coimmunoprecipitación, y la copurificación a través de gradientes o en columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden controlarse utilizando un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores [Fields and Song, Nature, 340:245-246 (1989); Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991)] como se describe en Chevray y Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5789-5793 (1991)]. Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión a ADN, mientras que el otro funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levaduras descrito en las publicaciones antes mencionadas (generalmente denominados como "sistema del doble híbrido") aprovecha esta propiedad, y utiliza dos

proteínas híbridas, una en la que la proteína diana se fusiona al dominio de unión a ADN de GAL4, y otra en la que las proteínas activadoras candidatas se fusionan al dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1/*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4, depende de la reconstitución de la actividad GAL4 a través de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interaccionan se detectan con un sustrato cromogénico para la β -galactosidasa. Existe un kit completo (MATCHMAKER™) disponible comercialmente por Clontech para la identificación de interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica del doble híbrido. Este sistema también puede extenderse para localizar dominios proteicos implicados en interacciones proteicas específicas, así como para señalar los residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

[0223] Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen que codifica un polipéptido IL-17A/F identificado aquí y otros componentes intra o extracelulares pueden ser analizados tal como se indica a continuación: habitualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra o extracelular en condiciones y durante un tiempo para permitir la interacción y la unión de los dos productos. Para analizar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se realiza en ausencia y en presencia del compuesto a analizar. Además, puede añadirse un placebo a una tercera mezcla de reacción para utilizarse como control positivo. La unión (formación del complejo) entre el compuesto a analizar y el componente intra o extracelular presente en la mezcla se controla tal como se describió anteriormente. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción, que contiene el compuesto a analizar indica que el compuesto a analizar interfiere con la interacción del compuesto a analizar y su pareja de reacción.

[0224] Para analizar antagonistas, el polipéptido IL-17A/F puede añadirse a una célula junto con el compuesto a cribar por una actividad particular y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido IL-17A/F indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido IL-17A/F. Alternativamente, se pueden detectar antagonistas mediante la combinación del polipéptido IL-17A/F y un potencial antagonista con receptores del polipéptido IL-17A/F unidos a membrana o receptores recombinantes bajo condiciones adecuadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido IL-17A/F puede marcarse, mediante, por ejemplo, radioactividad, de manera que el número de moléculas del polipéptido IL-17A/F unidas al receptor pueden usarse para determinar la eficacia del potencial antagonista. El gen que codifica el receptor puede identificarse mediante numerosos procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, cribado ("panning") de ligandos y separación por FACS. Coligan et al., *Current Protocols in Immun.*, 1(2): capítulo 5(1991). Preferiblemente, se emplea la clonación de expresión donde se prepara ARN poliadenilado a partir de una célula sensible al polipéptido IL-17A/F y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se divide en grupos y se usa para transfectar células COS u otras células que no son sensibles al polipéptido IL-17A/F. Las células transfectadas que crecen en portaobjetos de cristal se exponen al polipéptido IL-17A/F marcado. El polipéptido IL-17A/F puede marcarse mediante distintos medios incluyendo la yodación o la inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica para un sitio. Tras la fijación e incubación, los portaobjetos se someten a un análisis autorradiográfico. Los grupos positivos se identifican y se preparan subgrupos y se retransfectan usando un proceso interactivo de subagrupamiento y recribado, que finalmente producen un único clon que codifica el receptor putativo.

[0225] Como estrategia alternativa para la identificación de un receptor, el polipéptido IL-17A/F marcado puede unirse por fotoafinidad con preparaciones de membrana o extractos celulares que expresan la molécula receptora. El material entrecruzado se resuelve por PAGE y se expone a una película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor puede cortarse, separarse en pequeños fragmentos y someterse a microsecuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida por microsecuenciación se utilizaría para diseñar un conjunto de sondas de oligonucleótidos degenerados para cribar una biblioteca de ADNc para identificar el gen que codifica el receptor putativo.

[0226] En otro ensayo para antagonistas, se incubarían células de mamífero o una preparación de membrana que expresan el receptor con el polipéptido IL-17A/F marcado en presencia del compuesto candidato. A continuación, se podría medir la capacidad del compuesto de aumentar o bloquear esta interacción.

[0227] Ejemplos más específicos de potenciales antagonistas incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con el polipéptido IL-17A/F y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos antiidiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un potencial antagonista puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido IL-17A/F que reconozca el receptor, pero que no ejerza ningún efecto, inhibiendo así competitivamente la acción del polipéptido IL-17A/F.

[0228] Otro antagonista potencial del polipéptido IL-17A/F es una construcción de ARN o ADN no codificante preparada usando la tecnología no codificante, donde, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN no codificante actúa bloqueando directamente la traducción de ARNm mediante la hibridación con el ARNm diana y evitando la traducción de la proteína. La tecnología no codificante puede usarse para controlar la expresión génica a través de la formación de una triple hélice o del ADN o ARN no codificante, ambos procedimientos basados en la unión de un polinucleótido

al ADN o al ARN. Por ejemplo, la región codificante 5' de la secuencia de polinucleótidos, que codifica el polipéptido IL-17A/F maduro de la presente descripción se usa para diseñar un oligonucleótido de ARN no codificante de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice- véase, Lee et al., Nucl. Acids Res., 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science, 241:456 (1988); Dervan et al., Science, 251:1360 (1991)], evitando así la transcripción y la producción del polipéptido IL-17A/F. El oligonucleótido de ARN no codificante se hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido IL-17A/F (no codificante-Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expresión (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente pueden también liberarse a células, de manera que el ARN o ADN no codificante puede ser expresado *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido IL-17A/F. Cuando se usa un ADN no codificante, se prefieren oligodesoxirribonucleótidos derivados del la región de inicio de la traducción, por ejemplo, entre las posiciones de aproximadamente -10 a +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

[0229] Los antagonistas potenciales incluyen moléculas pequeñas que se unen al sitio activo, el sitio de unión del receptor, o el factor de crecimiento u otro sitio de unión relevante del polipéptido IL-17A/F, bloqueando de este modo la actividad biológica normal del polipéptido IL-17A/F. Entre los ejemplos de moléculas pequeñas se incluyen, pero sin limitación, péptidos o moléculas de tipo péptido pequeñas, preferiblemente péptidos solubles, y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos.

[0230] Los ribozimas son moléculas de ARN enzimático capaces de catalizar la escisión específica del ARN. Las ribozimas actúan mediante hibridación específica de secuencia con el ARN diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Los sitios de escisión específicos de ribozimas en un ARN diana potencial se pueden identificar mediante técnicas conocidas. Para más detalles, véase, por ejemplo, Rossi, Current Biology, 4: 469-471 (1994), y la publicación PCT No. WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre 1997).

[0231] Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice utilizadas para inhibir la transcripción deberían ser de cadena sencilla y compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de manera que provoca la formación de una triple hélice a través de las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, lo cual requiere generalmente tramos ajustables de purinas o pirimidinas en una cadena de una cadena doble. Para más detalles, véase, por ejemplo, la publicación PCT No. WO 97/33551, supra.

[0232] Estas moléculas pequeñas se pueden identificar mediante uno o más de los ensayos de cribado descritos anteriormente y/o mediante cualquiera otra técnica de cribado conocida para los expertos en la materia.

[0233] Los usos como diagnóstico y terapéuticos de las moléculas aquí descritas también se pueden basar en los resultados positivos del ensayo funcional positivo dado a conocer y descrito a continuación.

F. Distribución en los tejidos

[0234] La localización de los tejidos que expresan IL-17A/F puede identificarse determinando la expresión de ARNm en diversos tejidos humanos. La localización de estos genes proporciona información acerca de qué tejidos es más probable que resulten afectados por las actividades de estimulación y de inhibición de los polipéptidos IL-17A/F. La localización de un gen en un tejido específico también proporciona tejido e muestra para los ensayos de bloqueo de actividad comentados posteriormente.

[0235] Tal como se ha indicado anteriormente, la expresión génica en diversos tejidos puede medirse mediante transferencia southern, transferencia northern convencional para cuantificar la transcripción del ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205, 1980), la transferencia por puntos (análisis del ADN), o la hibridación *in situ*, utilizando una sonda apropiadamente marcada, basándose en las secuencias proporcionadas en la presente descripción. Alternativamente, pueden utilizarse anticuerpos que pueden reconocer dobles cadenas específicas, incluyendo dobles cadenas de ADN, dobles cadenas de ARN, y dobles cadenas híbridas ADN-ADRN o dobles cadenas ADN-proteína.

[0236] Alternativamente, puede medirse la expresión génica en diversos tejidos mediante procedimientos inmunológicos, tales como la tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido y el ensayo de cultivo celular o de líquidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de líquidos de muestra puede ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente los anticuerpos pueden prepararse contra una secuencia nativa de un polipéptido IL-17A/F o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN codificante del polipéptido IL-17A/F o contra una secuencia exógena fusionada con un ADN codificante de un polipéptido IL-17A/F y codificante de un epítipo específico de anticuerpo. Se proporcionan posteriormente técnicas generales para generar anticuerpos, y protocolos especiales para la transferencia northern y la hibridación *in situ*.

G. Estudios de unión de anticuerpos

[0237] La actividad de los polipéptidos IL-17A/F puede verificarse adicionalmente mediante estudios de unión de anticuerpo, en los que se somete a ensayo la capacidad de los anticuerpos anti-IL-17A/F de inhibir el efecto de los polipéptidos IL-17A/F, respectivamente en células de tejido. Entre los anticuerpos ejemplares se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados, la preparación de los cuales se describe a continuación en la presente memoria.

[0238] Pueden llevarse a cabo ensayos de unión de anticuerpos de cualquier procedimiento de ensayo conocido, tal como los ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, páginas 147 a 158 (CRC Press, Inc., 1987)).

[0239] Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un estándar marcado de competir con el analito de la muestra de ensayo para la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína diana en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de estándar que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de estándar que se une, los anticuerpos preferentemente se insolubilizan antes o después de la competición, de manera que el estándar y el analito que se encuentran unidos a los anticuerpos pueden separarse convenientemente del estándar y del analito que quedan no unidos.

[0240] Los ensayos sándwich implican la utilización de dos anticuerpos, cada uno de ellos capaz de unirse a una parte inmunogénica diferente, o epítipo de la proteína que debe detectarse. En un ensayo sándwich, el analito de la muestra de ensayo se une a un primer anticuerpo que se inmoviliza en un soporte sólido, y después un segundo anticuerpo se une al analito, formando de esta manera un complejo insoluble de tres partes (ver, por ejemplo, patente US nº 4.376.110). El segundo anticuerpo mismo puede marcarse con un grupo detectable (ensayo sándwich directo) o puede medirse utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que se marca con un grupo detectable (ensayo sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el grupo detectable es un enzima. Para la inmunohistoquímica, la muestra de tejido puede ser fresca o congelada o puede incluirse en parafina y fijarse con un conservante, tal como formalina, por ejemplo.

H. Ensayos basados en células

[0241] Los ensayos basados en células y los modelos animales para las enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico pueden utilizarse para comprender mejor la relación entre los genes y los polipéptidos identificados en la presente descripción y el desarrollo y la patogénesis de la enfermedad de tipo inmunológico.

[0242] En un enfoque diferente, las células de un tipo celular que es conocido que se encuentran implicadas en una enfermedad de tipo inmunológico particular se transfectan con los ADNcs descritos en la presente descripción, y se analiza la capacidad de estos ADNcs de estimular o de inhibir la función inmunológica. Pueden transfectarse células adecuadas con el gen deseado, y se realizó el seguimiento de la actividad de función inmunológica. Estas líneas celulares transfectadas seguidamente pueden utilizarse para someter a ensayo la capacidad de los anticuerpos policlonales o monoclonales o de las composiciones de anticuerpo de inhibir o de estimular la función inmunológico, por ejemplo de modular la proliferación de las células T o la infiltración de células inflamatorias. Las células transfectadas con las secuencias codificantes de los genes identificados en la presente descripción además pueden utilizarse para identificar los fármacos candidatos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico.

[0243] Además, los cultivos primarios derivados de animales transgénicos (tal como se describe posteriormente) pueden utilizarse en los ensayos basados en células de la presente descripción, aunque resultan preferentes las líneas celulares estables. Las técnicas para derivar líneas celulares continuas a partir de animales transgénicos son bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Small *et al.*, Mol. Cell. Biol. 5:642-648, 1985).

[0244] Un ensayo basado en células adecuado es la reacción de linfocitos mixtos (MLR), Current Protocols in Immunology, unidad 3.12, editado por J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D.H. Marglies, E.M. Shevach, W. Strober, National Institutes of Health, publicado por John Wiley & Sons, Inc. En este ensayo, se prueba la capacidad de un compuesto de ensayo de estimular o de inhibir la proliferación de las células T activadas. Se cultiva una suspensión de células T respondedoras con células estimuladoras alogénicas y se mide la proliferación de las células T mediante la incorporación de la timidina tritiada. Este ensayo es una medida general de la reactividad de las células T. Debido a que la mayoría de las células T responden y producen IL-2 tras la activación, las diferencias de sensibilidad en esta ensayo en parte reflejan las diferencias en la producción de IL-2 por parte de las células respondedoras. Los resultados del MLR pueden verificarse con un ensayo de detección estándar de linfoquinas (IL-2) (Current Protocols in Immunology, anteriormente, 3.15, 6.3).

[0245] Una respuesta proliferativa de las células T en un ensayo MLR puede deberse a propiedades mitogénicas directas de una molécula sometida a ensayo o a la activación externa inducida por antígeno. La verificación adicional de la actividad estimuladora de las células T por parte de los polipéptidos IL-17A/F puede llevarse a cabo utilizando un ensayo de coestimulación. La activación de las células T requiere una señal específica de antígeno mediada a través de receptores del receptor de las células T (TCR) y una señal coestimuladora mediada a través de una segunda

interacción de unión a ligando, por ejemplo la interacción de unión B7 (CD80, CD86)/CD28. La reticulación de CD28 incrementa la secreción de las linfocinas por parte de las células T activadas. La activación de las células T presenta controles tanto negativos como positivos a través de la unión de ligandos que presentan un efecto negativo o positivo. CD28 y CTLA-4 son glucoproteínas relacionadas en la superfamilia de Ig que se unen a B7. La unión de CD28 a B7 presenta un efecto de coestimulación positivo sobre la activación de las células T; a la inversa, la unión de CTLA-4 a B7 presenta un efecto negativo, de desactivación de las células T (Chambers, C.A. y Allison, J.P., *Curr. Opin. Immunol.* 9:396, 1997; Schwartz, R.H., *Cell* 71:1065, 1992; Linsey, P.S. y Ledbetter, J.A., *Annu. Rev. Immunol.* 11:191, 1993; June, C.H. *et al.*, *Immunol. Today* 15:321, 1994; Jenkins, M.K., *Immunity* 1:405, 1994. En un ensayo de coestimulación, se someten a ensayo los polipéptidos IL-17A/F para la actividad coestimuladora o inhibidora de las células T.

[0246] Los polipéptidos IL-17A/F que son estimuladores (coestimuladores) de la proliferación de las células T y agonistas, por ejemplo anticuerpos agonistas, de los mismos según se determina mediante MLR y ensayos de coestimulación, por ejemplo, resultan útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico caracterizadas por una función inmunológica pobre, subóptima o inadecuada. Estas enfermedades se tratan estimulando la proliferación y la activación de las células T (y la inmunidad mediada por las células T) e intensificando la respuesta inmunológica en un mamífero mediante la administración de un compuesto estimulador, tal como los polipéptidos IL-17A/F estimuladores. El polipéptido estimulador puede ser, por ejemplo, un polipéptido IL-17A/F o un anticuerpo agonista del mismo.

[0247] La utilización directa de un compuesto estimulador según la descripción ha sido validada en experimentos con glucoproteína 4-1BB, un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral, que se une a un ligando (4-1BBL) expresado en células T cebadas y señaliza la activación y crecimiento de las células T (Alderson, M.E. *et al.*, *J. Immunol.* 24:2219, 1994).

[0248] La utilización de un compuesto estimulador agonista también ha sido validada experimentalmente. La activación de 4-1BB mediante el tratamiento con un anticuerpo agonista anti-4-1BB incrementa la erradicación de los tumores (Hellstrom, I. y Hellstrom, K.E., *Crit. Rev. Immunol.* 18:1, 1998). La terapia inmunoadyuvante para el tratamiento de tumores, descrita en más detalle posteriormente, es otro ejemplo de la utilización de los compuestos estimuladores de la descripción. También puede conseguirse un efecto estimulador o intensificador inmunológico mediante la antagonización o bloqueo de la actividad de un IL-17A/F que se ha encontrado que es inhibidor en el ensayo MLR. La negación de la actividad inhibidora del compuesto produce un efecto estimulador neto. Son compuestos antagonistas/bloqueantes adecuados los anticuerpos o fragmentos de los mismos que reconocen y se unen a la proteína inhibidora, bloqueando de esta manera la interacción eficaz de la proteína con su receptor, e inhibiendo la señalización a través del receptor. Este efecto ha sido validado en experimentos utilizando anticuerpos anti-CTLA-4 que incrementan la proliferación de las células T, presumiblemente mediante eliminación de la señal inhibidora causada por la unión de CTLA-4 (Walunas, T.L. *et al.*, *Immunity* 1:405, 1994).

[0249] Alternativamente, también puede conseguirse un efecto estimulador o intensificador inmunológico mediante la administración de un polipéptido IL-17A/F que presente propiedades incrementadoras de la permeabilidad vascular. La permeabilidad vacuolar incrementada resultaría beneficiosa para trastornos que pueden atenuarse mediante la infiltración local de células inmunológicas (por ejemplo monocitos, eosinófilos, PMNs) y la inflamación.

[0250] Por otra parte, los polipéptidos IL-17A/F, así como otros compuestos de la invención, que son inhibidores directos de la proliferación/activación de las células T, la secreción de linfocinas y/o la permeabilidad vascular pueden utilizarse directamente para suprimir la respuesta inmunológica. Estos compuestos resultan útiles para reducir el grado de la respuesta inmunológica y para tratar las enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico caracterizadas por una respuesta hiperactiva, superóptima o autoinmune. Esta utilización de los compuestos de la invención ha sido validada mediante los experimentos descritos anteriormente, en los que la unión de CTLA-4 al receptor B7 desactiva las células T. Los compuestos inhibidores directos de la invención funcionan de una manera análoga. La utilización de un compuesto que suprime la permeabilidad vascular se esperaría que redujese la inflamación. Este tipo de usos resultaría beneficioso en el tratamiento de condiciones asociadas a la inflamación excesiva.

[0251] Alternativamente, los compuestos, por ejemplo anticuerpos, que se unen a polipéptidos IL-17A/F estimuladores y que bloquean el efecto estimulador de estas moléculas, producen un efecto inhibidor neto y puede utilizarse para suprimir la respuesta inmunológica mediada por las células T, mediante la inhibición de la proliferación/activación de las células T y/o la secreción de linfocinas. El bloqueo del efecto estimulador de los polipéptidos suprime la respuesta inmunológica del mamífero. Esta utilización ha sido validada en experimentos utilizando un anticuerpo anti-IL2. En estos experimentos, el anticuerpo se une a IL2 y bloquea la unión de IL2 a su receptor, consiguiendo de esta manera un efecto inhibidor de las células T.

I. Modelos animales

[0252] Los resultados de los ensayos *in vitro* basados en células pueden verificarse adicionalmente utilizando modelos animales y ensayos *in vivo* para la función de las células T. Puede utilizarse una diversidad de modelos animales bien conocidos para comprender mejor el papel de los genes identificados en la presente descripción en el desarrollo y la

patogénesis de la enfermedad de tipo inmunológico, y para someter a ensayo la eficacia de agentes terapéuticos candidatos, incluyendo anticuerpos, y otros antagonistas de los polipéptidos nativos, incluyendo antagonistas de molécula pequeña. La naturaleza *in vivo* de dichos modelos los convierte en predictivos de respuestas en pacientes humanos. Entre los modelos animales de enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico se incluyen animales tanto no recombinantes como recombinantes (transgénicos). Entre los modelos animales no recombinantes se incluyen, por ejemplo, los modelos de roedor, por ejemplo murinos. Estos modelos pueden generarse mediante la introducción de células en ratones singénicos utilizando técnicas estándares, por ejemplo la inyección subcutánea, la inyección en la vena de la cola, el implante de bazo, el implante intraperitoneal, el implante bajo la cápsula renal, etc.

[0253] La enfermedad del injerto contra el huésped se produce cuando se trasplantan células inmunocompetentes en pacientes inmunosuprimidos o tolerantes. Las células donantes reconocen y responden a los antígenos del huésped. La respuesta puede variar entre inflamación severa potencialmente letal y casos leves de diarrea y pérdida de peso. Los modelos de enfermedad de injerto contra el huésped proporcionan un medio para evaluar la reactividad de las células T contra los antígenos del MHC y antígenos del trasplante menores. Se describe un procedimiento adecuado en detalle en *Current Protocols in Immunology*, anteriormente, unidad 4.3.

[0254] Un modelo animal de rechazo del aloinjerto de la piel es un medio para someter a ensayo la capacidad de las células T de mediar en la destrucción *in vivo* de tejido y una medida de su papel en el rechazo del trasplante. Los modelos más comunes y aceptados utilizando injertos de piel de cola murina. Algunos experimentos repetidos han demostrado que el rechazo del aloinjerto de la piel se encuentra mediado por células T, células T ayudantes y células T asesinas efectoras y no anticuerpos (Auchincloss, H. Jr. y Sachs, D.H., *Fundamental Immunology*, 2a edición, W. E. Paul, editor, Raven Press, NY, 1989, 889 a 992). Se describe en detalle un procedimiento adecuado en *Current Protocols in Immunology*, anteriormente, unidad 4.4. Otros modelos de rechazo del trasplante que pueden utilizarse para someter a ensayo los compuestos de la invención son los modelos de trasplante alogénico de corazón descritos por Tanabe, M. *et al.*, *Transplantation* 58:23, 1994, y Tinubu, S.A. *et al.*, *J. Immunol.* 4330-4338, 1994.

[0255] Los modelos animales para la hipersensibilidad de tipo retardado también proporcionan un ensayo de la función inmunológica mediada por células. Las reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado son una respuesta inmunológica *in vivo* mediada por células T caracterizadas por inflamación que no alcanza un pico hasta que ha transcurrido un periodo de tiempo tras el reto con un antígeno. Estas reacciones también se producen en enfermedades autoinmunes específicas de tejido, tales como la esclerosis múltiple (MS) y la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE, un modelo para la MS). Se describe en detalle un procedimiento adecuado en *Current Protocols in Immunology*, anteriormente, unidad 4.5.

[0256] La EAE es una enfermedad autoinmune mediada por células T caracterizada por inflamación de células T y de células mononucleares y la desmielinización posterior de los axones en el sistema nervioso central. La EAE se considera generalmente un modelo animal relevante para la MS en el ser humano (Bolton, C., *Multiple Sclerosis* 1:143, 1995). Se han desarrollado modelos tanto agudos como de recaída-remisión. Los compuestos de la invención pueden someterse a ensayo para actividad estimuladora o inhibidora de las células T contra una enfermedad desmielinizante mediada inmunológicamente utilizando el protocolo descrito en *Current Protocols in Immunology*, anteriormente, unidades 15.1 y 15.2. Ver también los modelos de enfermedad de la mielina en los que se injertan oligodendrocitos o células de Schwann en el sistema nervioso central tal como se describe en Duncan, I.D. *et al.*, *Molec. Med. Today* 554-561, 1997.

[0257] La hipersensibilidad por contacto es un ensayo *in vivo* simple de hipersensibilidad de tipo retardado de función inmunológica mediada por células. En este procedimiento, se mide y se cuantifica la exposición cutánea a haptenos exógenos que dan lugar a una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado. La sensibilidad por contacto implica una etapa inicial de sensibilización seguida de una etapa de inducción. La fase de inducción se produce cuando los linfocitos T se encuentran con un antígeno con el que han tenido contacto anteriormente. Se produce hinchazón e inflamación, convirtiéndolo en un modelo excelente de dermatitis alérgica por contacto humana. Se describe en detalle un procedimiento adecuado en *Current Protocols in Immunology*, editores J.E. Cologan, A.M. Kruisbeek, D.H. Margulies, E.M. Shevach y W. Strober, John Wiley & Sons, Inc., 1994, unidad 4.2. Ver también Grabbe, S. y Schwarz, T., *Immun. Today* 19(1):37-44, 1998.

[0258] Un modelo animal de artritis es la artritis inducida por colágeno. Este modelo comparte características clínicas, histológicas e inmunológicas con la artritis reumatoide autoinmune humana y es un modelo aceptable de artritis autoinmune humana. Los modelos de ratón y de rata se caracterizan por sinovitis, erosión del cartílago y del hueso subcondral. Los compuestos de la invención pueden someterse a ensayo para actividad contra la artritis autoinmune utilizando los protocolos descritos en *Current Protocols in Immunology*, anteriormente, unidades 15.5. Ver también el modelo que utiliza un anticuerpo monoclonal contra las integrinas CD18 y VLA-4 descritas en Issekutz, A.C. *et al.*, *Immunology* 88:569, 1996.

[0259] Se ha descrito un modelo de asma en el que se provoca hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por antígeno, eosinofilia e inflamación pulmonares sensibilizando un animal con ovoalbúmina y después retando el animal con la misma proteína administrada mediante aerosol. Varios modelos animales (cobaya, rata, primate no humano)

muestran síntomas similares al asma atópica en el ser humano tras el reto con antígenos en aerosol. Los modelos murinos presentan muchas de las características del asma humana. Se describen procedimientos adecuados para someter a ensayo los compuestos de la invención para actividad y eficacia en el tratamiento del asma en Wolyniec, W.W. *et al.*, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 18:777, 1998, y en las referencias citadas en el mismo.

[0260] Además, los compuestos de la invención pueden someterse a ensayo en modelos animales de enfermedades similares a la soriasis. La evidencia sugiere una patogénesis de células T para la soriasis. Los compuestos de la invención pueden someterse a ensayo en el modelo de ratón scid/scid descrito por Schon, M.P. *et al.*, Nat. Med. 3:183, 1997, en el que los ratones muestran lesiones histopatológicas de la piel similares a la soriasis. Otro modelo adecuado es la quimera piel humana/ratón scid preparada tal como describen Nickoloff, B.J. *et al.*, Am. J. Path. 146:580, 1995.

[0261] Pueden construirse modelos animales recombinantes (transgénicos) no humanos mediante la introducción de la parte codificante de los genes identificados aquí en el genoma de los animales de interés utilizando técnicas estándar para la producción de animales transgénicos. Entre los animales que pueden servir como diana para la manipulación transgénica se incluyen, aunque sin limitación, ratones, ratas, conejos, cobayas, ovejas, cabras, cerdos y primates no humanos, por ejemplo babuinos, chimpancés y monos. Entre las técnicas conocidas de la técnica para introducir un transgén en dichos animales se incluyen la microinyección pronucleica (Hoppe y Wanger, patente US nº 4.873.191), la transferencia génica mediada por retrovirus en líneas germinales (por ejemplo Van der Putten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-615, 1985), el "gen targeting" en células madre embrionarias (Thompson *et al.*, Cell 56:313-321, 1989), la electroporación de embriones (Lo, Mol. Cell Biol. 3:1803-1814, 1983) y la transferencia génica mediada por esperma (Lavitrano *et al.*, Cell 57:717-73, 1989). Para una revisión ver, por ejemplo, la patente US nº 4.736.866.

[0262] Para los fines de la presente descripción, los animales transgénicos incluyen aquellos que portan únicamente el transgén en parte de las células de los mismos ("animales mosaico"). El transgén puede integrarse en forma de un único transgén, o en concatámeros, por ejemplo tandems de cabeza con cabeza o de cabeza con cola. La introducción selectiva de un transgén en un tipo celular particular también resulta posible siguiendo, por ejemplo, la técnica de Lasko *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-636, 1992.

[0263] La expresión del transgén en animales transgénico puede monitorizarse mediante técnicas estándar. Por ejemplo, el análisis de transferencia southern o la amplificación por PCR pueden utilizarse para verificar la integración del transgén. A continuación puede analizarse el nivel de expresión de ARNm utilizando técnicas tales como la hibridación *in situ*, el análisis de transferencia northern, la PCR o la inmunocitoquímica.

[0264] Los animales pueden examinarse adicionalmente para indicios de patología de enfermedad inmunológica, por ejemplo mediante examen histológico, para determinar la infiltración de las células inmunológicas en tejidos específicos. También pueden llevarse a cabo experimentos de bloqueo, en los que los animales transgénicos se tratan con los compuestos de la invención para determinar el grado de estimulación o inhibición de la proliferación de las células T provocado por los compuestos. En estos experimentos, se administran anticuerpos bloqueantes que se unen al polipéptido IL-17A/F, preparados tal como se ha descrito anteriormente, en el animal y se determina el efecto sobre la función inmunológica.

[0265] Alternativamente, pueden construirse animales "knock out", que presentan un gen defectuoso o alterado codificante de un polipéptido identificado en la presente descripción, como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno codificante del polipéptido y ADN genómico alterado codificante del mismo polipéptido introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, puede utilizarse ADNc codificante de un polipéptido particular para clonar ADN genómico codificante de ese polipéptido según técnicas establecidas. Puede delecionarse una parte del ADN genómico codificante de un polipéptido particular o sustituirse por otro gen, tal como un gen codificante de un marcador seleccionable que puede utilizarse para realizar el seguimiento de la integración. Típicamente se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante no alterado (tanto en el extremo 5' como en el extremo 3') [ver, por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell 51:503, 1987, para una descripción de los vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea celular madre embrionaria (por ejemplo mediante electroporación) y se seleccionan células en las que el ADN introducido se ha recombinado homológamente con el ADN endógeno [ver, por ejemplo, Li *et al.*, Cell 69:915, 1992]. Las células seleccionadas seguidamente se inyectan en un blastocito de un animal (por ejemplo un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación [ver, por ejemplo, Bradley, en: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, editor (IRL, Oxford, 1987), páginas 113 a 152]. A continuación, puede implantarse un embrión quimérico en una hembra nodriza pseudoembarazada adecuada y llevar el embrión a término, creando un animal "knock out". La progenie que porta el ADN homológamente recombinado en sus células germinales puede identificarse mediante técnicas estándares y utilizarse para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN homológamente recombinado. Los animales knockout pueden caracterizarse, por ejemplo, por su capacidad de defenderse frente a determinadas condiciones patológicas y por su desarrollo de condiciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido.

J. Terapia con inmunoadyuvantes

[0266] En una realización, los compuestos inmunoestimuladores de la descripción pueden utilizarse en terapia con inmunoadyuvantes para el tratamiento de tumores (cáncer). En la actualidad está bien establecido que las células T reconocen antígenos específicos de tumor humano. Un grupo de antígenos tumorales, codificado por las familias de genes MAGE, BAGE y GAGE, son silenciosos en todos los tejidos adultos normales, pero se expresan en cantidades significativas en los tumores, tales como los melanomas, los tumores pulmonares, los tumores de cabeza y cuello y los carcinomas de vejiga (DeSmet, C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7149, 1996). Se ha demostrado que la coestimulación de las células T induce la regresión de los tumores y una respuesta antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo* (Melero, I. *et al.*, Nature Medicine 3:682, 1997; Kwon, E.D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:8099, 1997; Lynch, D.H. *et al.*, Nature Medicine 2:625, 1997; Finn, O.J. y Lotze, M.T., J. Immunol. 21:114, 1998). Los compuestos estimuladores de la descripción pueden administrarse en forma de adyuvantes, solos o conjuntamente con un agente regulador del crecimiento, agente citotóxico o agente quimioterapéutico, con el fin de estimular la proliferación/activación de las células T y una respuesta antitumoral frente a los antígenos tumorales. El agente regulador del crecimiento, citotóxico o quimioterapéutico puede administrarse en cantidades convencionales en regímenes de administración conocidos. La actividad inmunoestimuladora de los compuestos de la descripción permite utilizar cantidades reducidas de los agentes reguladores del crecimiento, citotóxicos o quimioterapéuticos, potencialmente rebajando de esta manera la toxicidad para el paciente.

K. Ensayos de cribado para fármacos candidatos

[0267] Los ensayos de cribado para fármacos candidatos se diseñan para identificar compuestos que se unen o se acoplean con los polipéptidos codificados por los genes identificados en el presente documento o a un fragmento biológicamente activo de los mismos, o de otra manera interfieren con la interacción entre los polipéptidos codificados y otras proteínas celulares. Este tipo de ensayos de cribado incluye ensayos en los que puede aplicarse el cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciendo que resulten particularmente adecuados para identificar fármacos candidatos de molécula pequeña. Entre las moléculas pequeñas contempladas se incluyen compuestos sintéticos orgánicos o inorgánicos, incluyendo péptidos, preferentemente péptidos solubles, fusiones de (poli)péptido-inmunoglobulina y, en particular, anticuerpos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos antiidiotípicos y versiones químicas o humanizados de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos y fragmentos de anticuerpo humanos. Los ensayos pueden llevarse a cabo en una diversidad de formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que se encuentran bien caracterizados en la técnica. Todos los ensayos son comunes en el aspecto de que demandan la puesta en contacto del fármaco candidato y el polipéptido codificado por un ácido nucleico aquí identificado bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interaccionen.

[0268] En los ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido codificado por el gen identificado en la presente descripción o el fármaco candidato se inmoviliza sobre una fase sólida, por ejemplo sobre una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente generalmente se consigue mediante recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido y secando. Alternativamente, puede utilizarse un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido que debe inmovilizarse para anclarlo a una superficie sólida. El ensayo se lleva a cabo mediante la adición del componente no inmovilizado, que puede marcarse con un marcaje detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Tras completarse la reacción, se eliminan los componentes no reaccionados, por ejemplo mediante lavado, y los complejos anclados sobre la superficie sólida se detectan. En el caso de que el componente originalmente no inmovilizado porte un marcaje detectable, la detección del marcaje inmovilizado sobre la superficie indica que se ha producido acopleamiento. En el caso de que el componente originalmente no inmovilizado no porte un marcaje, puede detectarse el acopleamiento, por ejemplo mediante la utilización de un anticuerpo marcado que se una específicamente al complejo inmovilizado.

[0269] Si el compuesto candidato interacciona, aunque sin unirse, a una proteína particular codificada por un gen identificado en la presente descripción, la interacción del mismo con dicha proteína puede someterse a ensayo mediante procedimientos bien conocidos para la detección de las interacciones proteína-proteína. Entre este tipo de ensayos se incluyen los enfoques tradicionales, tales como la reticulación, la coimmunoprecipitación y la copurificación mediante gradientes o columnas cromatográficas. Además, puede realizarse el seguimiento de las interacciones proteína-proteína mediante la utilización de un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores [Fields y Song, Nature (London) 340:245-246, 1989; Chien *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:9578-7582, 1991], tal como dan a conocer Chevray y Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5789-5793, 1991. Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten de dos dominios modulares físicamente discretos, actuando uno como el dominio de unión al ADN, mientras el otro funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión levadura descrito en las publicaciones anteriormente indicadas (generalmente denominado "sistema de dos híbridos") se beneficia de esta propiedad, y utiliza proteínas de dos híbridos, una en la que la proteína diana se fusiona con el ADN-dominio de unión de GAL4, y el otro, en el que las proteínas activadoras candidatas se fusionan con el dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1-lacZ bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 mediante la interacción proteína-

proteína. Las colonias que contienen polipéptido interaccionantes se detectan con un sustrato cromogénico para la β -galactosidasa. Se encuentra disponible comercialmente de Clontech un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas utilizando la técnica de dos híbridos. Este sistema también puede extenderse al mapado de dominios de proteína implicados en interacciones específicas de proteínas, así como para identificar residuos aminoácidos que resulten cruciales para estas interacciones.

[0270] Con el fin de encontrar compuestos que interfieran con la interacción de un gen identificado en la presente descripción y otros componentes intracelulares o extracelulares, habitualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intracelular o extracelular bajo condiciones y durante un tiempo que permite la interacción y la unión de los dos productos. Para someter a ensayo la capacidad de un compuesto de ensayo de inhibir la unión, se corre la reacción en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, puede añadirse un placebo a una tercera mezcla de reacción, que sirva como control positivo. La unión (formación de complejo) entre el compuesto de ensayo y el componente intracelular o extracelular presente en la mezcla se monitoriza tal como se ha descrito anteriormente. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de ensayo indica que éste interfiere con la interacción del compuesto de ensayo y la pareja de reacción del mismo.

L. Composiciones y procedimientos para el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico

[0271] Entre las composiciones útiles en el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el sistema inmunológico se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, proteínas, anticuerpos, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, fosopéptidos, moléculas antisentido y ribozimas, moléculas de triple hélice, etc., que inhiben o estimulan la función inmunológica, por ejemplo la proliferación/activación de las células T, la liberación de linfoquinas o la infiltración de células inmunológicas.

[0272] Por ejemplo, las moléculas de ARN antisentido y de ARN actúan bloqueando directamente la traducción del ARNm mediante hibridación al ARNm diana y evitando la traducción en proteínas. En el caso de que se utilice ADN antisentido, resultan preferentes oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de traducción, por ejemplo entre las posiciones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

[0273] Los ribozimas son moléculas de ARN enzimático capaces de catalizar el corte específico del ARN. Los ribozimas actúan mediante hibridación específica de secuencia con el ARN diana complementario, seguido del corte endonucleolítico. Pueden identificarse mediante técnicas conocidas sitios específicos de corte de ribozima dentro de un ARN diana potencial. Para más detalles ver, por ejemplo, Rossi, Current Biology 4:469-471, 1994, y la publicación de patente PCT n° WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

[0274] Las moléculas de ácidos nucleicos en formación de triple hélice utilizadas para inhibir la transcripción deben ser de una sola cadena y estar compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de manera que estimule la formación de triple hélice siguiendo reglas de Hoogsteen de apareamiento de bases, que generalmente requiere tramos bastante grandes de purinas o de pirimidinas en una cadena de una doble cadena. Para más detalles ver, por ejemplo, la publicación de patente PCT n° WO 97/33551, *supra*.

[0275] Dichas moléculas pueden identificarse mediante cualquier combinación de los ensayos de cribado comentados anteriormente y/o mediante cualquier otra técnica de cribado bien conocida por los expertos en la materia.

M. Anticuerpos anti-IL-17A/F

[0276] La presente invención proporciona anticuerpos anti-IL-17A/F, tal como se definen en las reivindicaciones, que pueden ser útiles aquí como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico. Entre los anticuerpos de ejemplo se incluyen los anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

[0277] Los anticuerpos policlonales se desarrollan preferiblemente en animales mediante inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente (especialmente cuando se utilizan péptidos sintéticos) a una proteína que es inmunogénica en la especie a inmunizar. Por ejemplo, el antígeno se puede conjugar a la hemocianina de la lapa californiana (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

[0278] Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante la combinación de, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y la inyección intradérmica de la solución en múltiples sitios. Un mes

más tarde, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días más tarde los animales sangran y el suero se analiza por el título de anticuerpo. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. Los conjugados también se pueden producir en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, se utilizan de forma adecuada agentes de agregación, tales como el alumbre, para potenciar la respuesta inmune.

2. Anticuerpos monoclonales

[0279] Los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975) o se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567).

[0280] En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmunizan como se ha descrito anteriormente para conseguir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y se fusionan a continuación con una línea celular de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press. 1986)).

[0281] Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se desarrollan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas (también referidas como compañero de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas incluirán habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

[0282] Las células de mieloma de compañero de fusión preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, contribuyen a una producción estable a un nivel elevado de anticuerpo por las células seleccionadas productoras de los anticuerpos, y son sensibles a un medio selectivo que se selecciona contra las células parentales no fusionadas. Entre las líneas de células de mieloma preferidas están las líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y las células SP-2 y derivadas, por ejemplo, células X63-Ag8-653, disponibles en la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Estados Unidos. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); y Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

[0283] Se analiza el medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante la inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

[0284] La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis Scatchard de Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

[0285] Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden desarrollar mediante métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press, 1986)). Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPM1-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal, por ejemplo, mediante inyección i.p. de las células en los ratones.

[0286] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales, tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, utilizando proteína A o proteína G-Sefarosa) o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

[0287] El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células *E. Coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de ningún otro modo producen proteína anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Entre los artículos de revisión sobre la expresión

recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo se incluyen Skerra et al., *Curr. Opinión in Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol Revs.*, 130:151-188 (1992).

[0288] En una realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos monoclonales se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos generados utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Las posteriores publicaciones describen la producción de anticuerpos humanos de afinidad elevada (rango de nM) mediante intercambio de cadenas (Marks et al., *Biol. Technology*, 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas convencionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

[0289] El ADN que codifica el anticuerpo se puede modificar para producir polipéptidos anticuerpo quiméricos o de fusión, por ejemplo, mediante la sustitución de las secuencias de los dominios constantes de cadena pesada y ligera (C_H y C_L) humanos por las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o mediante la fusión de la secuencia codificante de inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias de polipéptidos que no son inmunoglobulinas se pueden sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo divalente quimérico que comprende un sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

3. Anticuerpos humanos y humanizados

[0290] Los anticuerpos anti-IL-17A/F de la presente invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Entre los anticuerpos humanizados se incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón ("framework") de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o el armazón importados. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado optimamente también comprenderá por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332 : 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)].

[0291] Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que habitualmente se obtienen de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de secuencias de CDRs o CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

[0292] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para utilizar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y la respuesta HAMA (anticuerpo anti-ratón de humano) cuando el anticuerpo pretende utilizarse para uso terapéutico humano. Según el método denominado "mejor-ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos conocidos. Se identifica el dominio V humano de la secuencia humana que está más próxima a la del roedor y se acepta la región de armazón (FR) humana en el mismo para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método utiliza una región de armazón particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región de armazón se puede utilizar para varios

anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

[0293] Es también importante que los anticuerpos se humanicen manteniendo una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles normalmente y son familiares para los expertos en la materia. Existen programas informáticos que muestran y visualizan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La observación de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de secuencias receptoras e importadas, de manera que se consigue la característica del anticuerpo deseado, tal como una mayor afinidad para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno.

[0294] Se contemplan varias formas de un anticuerpo anti-IL-17A/F humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como Fab, que está conjugado opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

[0295] Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de inmunoglobulina endógena en la producción. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión (JH) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y en la línea germinal da lugar a la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes en la línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación con antígenos. Ver, por ejemplo Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2551-255 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362, 255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993); y las Patentes de Estados Unidos 5.545.806, 5.569.825 y 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.547.807; y WO 97/17852.

[0296] Alternativamente, la tecnología de expresión de fagos (McCafferty et al., *Nature* 348, 552-553 [1990]) se puede utilizar para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos in vitro, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en el marco en un gen de proteína de recubrimiento principal o secundario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena sencilla del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. De este modo, el fago mimetiza algunas de las propiedades de la célula B. La expresión en fagos se puede realizar en una variedad de formatos; para su revisión ver, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3, 564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V para la expresión en fagos. Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991) aislaron un conjunto diverso de anticuerpos de anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para un conjunto diverso de antígenos (incluyendo auto-antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991), o Griffith et al., *EMBO J.* 12, 725-734 (1993). Véase también las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.565.332 y 5.573.905.

[0297] Tal como se ha descrito anteriormente, también se pueden generar anticuerpos humanos por células B activadas *in vivo* (véase las Patentes de Estados Unidos 5.567.610 y 5.229.275).

4. Fragmentos de anticuerpos

[0298] En ciertas circunstancias, existen ventajas en la utilización de fragmentos de anticuerpos, en lugar de los anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una depuración rápida y puede conducir a un mejor acceso a los tumores sólidos.

[0299] Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Habitualmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir actualmente directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv se pueden todos expresar en y secretarse de *E. Coli*, permitiendo así

la producción simple de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de las bibliotecas de anticuerpos en fagos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E coli* y pueden acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Según otra estrategia, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ con una mayor vida media in vivo que comprenden residuos de epítipo de unión a receptor salvaje se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el técnico de la materia. En otras realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase WO 93/16185; Patente de Estados Unidos No. 5.571.894; y Patente de Estados Unidos No. 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos carentes de regiones constantes; de este modo, son adecuadas para una unión no específica reducida durante el uso in vivo. Las proteínas de fusión con sFv se pueden construir para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi de un sFv. Véase, Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, supra. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

5. Anticuerpos biespecíficos

[0300] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión con por lo menos dos antígenos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos de ejemplos se pueden unir con dos epítopos diferentes de una proteína IL-17A/F tal como se describe en el presente documento. Uno de dichos anticuerpos puede combinar un sitio de unión a IL-17A/F con un sitio de unión para otra proteína. Alternativamente, se puede combinar un brazo anti-IL-17A/F con un brazo que se une a una molécula desecadenante en un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD3), receptores Fc para IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), para centrar y localizar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa IL-17A/F. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan IL-17A/F. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a IL-17A/F y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno con isótopo radioactivo. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

[0301] El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRIII y la patente de Estados Unidos No. 5,837,234 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRI. En WO98/02463 se muestra un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/Fcα. La patente de Estados Unidos No. 5,821,337 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-CD3.

[0302] Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción habitual de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda y los rendimientos de producto son bajos. En WO 93/08829 y en Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655 (1991) se describen procesos similares.

[0303] Según una estrategia diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se produce preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de Ig, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, CH₂ y CH₃. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (CH₁) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera esté presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en una célula huésped adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas de polipéptido en un único vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen un efecto significativo en el rendimiento de la combinación de cadenas deseadas.

[0304] En una realización preferida de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de

inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera sencilla de separación. Esta estrategia se describe en WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

[0305] Según otra estrategia, se puede diseñar la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivos de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte del dominio CH₃ de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales grandes de aminoácidos por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

[0306] Entre los anticuerpos biespecíficos se incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, y el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir las células del sistema inmunitario a células no deseadas (Patente de Estados Unidos No. 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980 junto con un grupo de técnicas de reticulación.

[0307] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se descomponen proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditiolos vecinales y evitar la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0308] El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico F(ab')₂ completamente humanizada. Cada fragmento de Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos. Se han descrito también varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diabody" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

[0309] Se consideran los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

6. Anticuerpos heteroconjugados

[0310] Se describen anticuerpos heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas [Patente de Estados Unidos No. 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por VIH [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de

reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este objetivo se incluyen el iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980.

7. Anticuerpos multivalentes

[0311] Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son diferentes de los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino terminales a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido del presente documento comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, pero preferiblemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende por lo menos una cadena polipeptídica (y preferiblemente dos cadenas polipeptídicas), donde la cadena o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o un polipéptido, y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente del presente documento comprende preferiblemente además por lo menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente descripción puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, además, comprenden un dominio CL.

8. Diseño de la función efectora

[0312] Se puede desear modificar el anticuerpo de la presente invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, con el fin de aumentar la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, el residuo o residuos de cisteínas se pueden introducir en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede mejorar la capacidad de internalización y/o incrementar la citólisis mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron et al., *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con una actividad anti-tumoral aumentada también se pueden preparar utilizando entrecruzadores heterobifuncionales tal y como se describe en Wolf et al. *Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede diseñar un anticuerpo para que tenga regiones Fc duales y, de esta manera, pueda aumentar la lisis por complemento y las capacidades de ADCC. Véase, Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230 (1989). Para aumentar la vida media en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor salvaje en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la Patente de Estados Unidos 5,739,277, por ejemplo. Tal como se utiliza aquí, el término "epítipo de unión al receptor salvaje" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable del incremento de la vida media en suero *in vivo* de la molécula IgG.

9. Inmunoconjugados

[0313] También se describen inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

[0314] Anteriormente se han descrito agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de dichos inmunoconjugados. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Existe un conjunto de radionucleidos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos son ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se fabrican utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como

dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitella *et al.*, *Science*, **238**: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026.

[0315] También se contemplan en el presente documento conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteno y CC1065 y los derivados de estas toxinas que tiene actividad de toxina.

Maitansina y maitnsinoides

[0316] Alternativamente, un anticuerpo anti-IL-17A/F (longitud completa o fragmentos) de la presente invención se conjuga a una o más moléculas maitansinoides.

[0317] Los maitansinoides son inhibidores mitotóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto *Maytenus serrata* del África del este (Patente de Estados Unidos No. 3,896,111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (Patente de Estados Unidos No. (4,151,042). El maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; y 4,371,533.

Conjugados maitansinoide-anticuerpo

[0318] En un intento por mejorar su índice terapéutico, se han conjugado la maitansina y los maitansinoides a anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,208,020, 5,416,064 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1, las memorias de las cuales se incorporan expresamente aquí por referencia, Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado como DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se observó que el conjugado era altamente citotóxico hacia las células del cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento de tumores *in vivo*. Chari *et al.*, *Cancer Research* **52**: 127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que se conjugó un maitansinoide a través de un enlace disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/*neu*. La citotoxicidad del conjugado Ta.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea de células de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de la superficie de HER-2 por célula. El fármaco conjugado consiguió un grado de citotoxicidad similar al del fármaco maitansinoide libre, que se podía incrementar mediante el incremento del número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una citotoxicidad sistémica baja en ratones.

Conjugados anticuerpo anti-polipéptido IL-17A/F-maitansinoide (inmunoconjugados)

[0319] Los conjugados de anticuerpo anti-IL-17A/F-maitansinoide se preparan mediante la unión química de un anticuerpo anti-IL-17A/F a una molécula maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo han mostrado una eficacia en el aumento de la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo aumentara la citotoxicidad sobre el uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se describen maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 y en las otras publicaciones de patente y no patente referidas anteriormente aquí. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como varios ésteres de maitansinol.

[0320] Existen muchos grupos enlazadores conocidos en la técnica para fabricar conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 o Patente EP 0 425 235 B1, y Chari *et al.*, *Cancer Research* **52**: 127-131 (1992). Los grupos enlazadores incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasa o grupos lábiles a esterasa, tal como se describe en las patentes identificadas anteriormente, siendo preferidos los grupos disulfuro y tioéter.

[0321] Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide se pueden fabricar utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-

(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como, dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como, bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzenceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173: 723-737 [1978]), y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

[0322] El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlace éster puede estar formado por la reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede tener lugar en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

Caliqueamicina

[0323] Otro inmunconjugado de interés comprende un anticuerpo anti-IL-17A/F conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas de ADN de doble cadena a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véanse las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,712,374; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,770,710; 5,773,001; y 5,877,296 (todas de la American Cyanamid Company). Entre los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden utilizar se incluyen, pero sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG, y θ_1^1 (Hinman et al, CancerRes 53: 3336-3342 (1993); Lode et al., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos mencionadas anteriormente de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral al que el anticuerpo se puede conjugar es QFA, un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos aumenta ampliamente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

[0324] Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar a los anticuerpos anti-IL-17A/F de la invención incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,053,394, 5,770,710, así como esperamicinas (patente de Estados Unidos 5,877,296).

[0325] Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

[0326] También se describe un inmunconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como una desorribonucleasa; ADNasa).

[0327] Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Existe un conjunto de isótopos radioactivos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se utiliza el conjugado para el diagnóstico, puede comprender un átomo radioactivo para estudios centellográficos, por ejemplo tc^{99m} o I^{123} , o un marcador de spin para la obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imagen por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123, de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[0328] Los radiomarcadores u otros marcadores se pueden incorporar en el conjugado de varias maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante la síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores, tales como, tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e ln^{111} se pueden unir mediante un residuo de cisteína en el péptido. El itrio-90 se puede unir mediante un residuo de lisina. El método de IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57) se puede utilizar para incorporar yodo-123. "Monoclonal antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

[0329] Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden fabricar utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como

dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietil triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador separable" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil en ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 [1992]; Patente de Estados Unidos No. 5,208,020).

[0330] Alternativamente, se puede producir una proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-IL-17A/F y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado ya sean adyacentes o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

[0331] Alternativamente, el anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el reconocimiento de tumores, en la que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente depurador y a continuación la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, radionucleótido).

10. Inmunoliposomas

[0332] Los anticuerpos anti-IL-17A/F aquí descritos también se pueden formular como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivo que es útil para la liberación de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma están dispuestos habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); Pat. de Estados Unidos Nos. 4.485.045 y 4.544.545; y WO97/38731 publicada el 23 de octubre de 1997. Liposomas con mayor tiempo de circulación se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.013.556.

[0333] Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente solicitud se pueden conjugar con los liposomas tal como se describe en Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. En el liposoma está contenido opcionalmente un agente quimioterapéutico. Véase Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989).

N. Oligopéptidos de unión a IL-17A/F

[0334] Los oligopéptidos de unión a IL-17A/F son oligopéptidos que se unen, preferiblemente específicamente, a un polipéptido IL-17A/F tal como se describe en el presente documento. Los oligopéptidos de unión a IL-17A/F se pueden sintetizar químicamente utilizando la metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificar utilizando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión a IL-17A/F tienen habitualmente por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ó 100 aminoácidos de longitud o más, donde dichos oligopéptidos son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido IL-17A/F tal como se describe en el presente documento. Los oligopéptidos de unión a IL-17A/F se pueden identificar sin una gran experimentación utilizando técnicas conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de oligopéptidos para oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; Publicación PCT Nos. WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 178-182 (1985); Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102: 259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140: 611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378; Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222: 581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8363, y Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2: 668).

[0335] En este aspecto, la expresión en bacteriófagos (fagos) es una técnica bien conocida que permite cribar

bibliotecas grandes de oligopéptidos para identificar el miembro o miembros de estas bibliotecas que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana. La expresión en fago es una técnica por la cual se expresan variantes de polipéptidos como proteínas de fusión a la proteína de recubrimiento en la superficie de partículas de bacteriófagos (Scott, J.K. and Smith, G. P. (1990) Science, 249: 386). La utilidad de la expresión en fagos radica en el hecho de que grandes bibliotecas de variantes de proteínas seleccionadas al azar (o ADNcs clonados al azar) se pueden separar rápida y eficazmente en las secuencias que se unen a una molécula diana con gran afinidad. La expresión de bibliotecas de péptidos (Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378) o proteínas (Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222: 581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8363) en fagos se ha utilizado para cribar millones de polipéptidos u oligopéptidos en aquellos con propiedades de unión específicas (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2: 668). La separación de la bibliotecas en fagos de mutantes aleatorios requiere una estrategia para construir y propagar un gran número de variantes, un procedimiento para la purificación por afinidad utilizando el receptor diana, y un medio de evaluación de los resultados de enriquecimientos de unión. Patentes de Estados Unidos nos. 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, y 5,663,143.

[0336] Aunque la mayoría de métodos de expresión en fago han utilizado sistemas de expresión en fago filamentoso, también son conocidos los sistemas de expresión en fago lamboide (WO 95/34683; U.S. 5,627,024), sistema de expresión en fago T4 (Ren, Z-J. et al. (1998) Gene 215:439; Zhu, Z. (1997) CAN 33: 534; Jiang, J. et al. (1997) can 128:44380; Ren, Z-J. et al. (1997) CAN 127:215644; Ren, Z-J. (1996) Protein Sci. 5: 1833; Efimov, V. P. et al. (1995) Virus Genes 10:173) y sistemas de expresión en fago T7 (Smith, G. P. and Scott, J.K. (1993) Methods in Enzymology, 217, 228-257; U.S. 5,766,905).

[0337] Actualmente se han desarrollado muchas otras mejoras y variaciones del concepto básico de expresión en fagos. Estas mejoras aumentan la capacidad de los sistemas de expresión para cribar bibliotecas de péptidos para unirse a moléculas diana seleccionadas y para expresar proteínas funcionales con el potencial de cribar estas proteínas por las propiedades deseadas. Se han desarrollado dispositivos de reacción combinatoria para las reacciones de expresión en fagos (WO 98/14277) y se han utilizado bibliotecas de expresión en fagos para analizar y controlar interacciones bimoleculares (WO 98/20169; WO 98/20159) y propiedades de péptidos helicoidales obligados (WO 98/20036). WO 97/35196 describe un método para aislar un ligando de afinidad en el que se pone en contacto una biblioteca de expresión en fagos con una solución en la que el ligando se unirá a una molécula diana y una segunda solución en la que el ligando de afinidad no se unirá a la molécula diana, para aislar selectivamente los ligandos de unión. WO 97/46251 describe un método para la bioadsorción de una biblioteca de expresión en fagos aleatoria con un anticuerpo purificado por afinidad y a continuación el aislamiento del fago de unión, seguido de un proceso de microadsorción utilizando pocillos de microplacas para aislar el fago de unión con afinidad elevada. También se ha descrito el uso de proteína A de *Staphylococcus aureus* como etiqueta de afinidad (Li et al. (1998) Mol Biotech., 9: 187). WO 97/47314 describe el uso de bibliotecas de sustracción de sustrato para distinguir las especificidades de enzima utilizando una biblioteca combinatoria que puede ser una biblioteca de expresión en fagos. En WO 97/094446 se describe un método para seleccionar enzimas adecuadas para su uso en detergentes utilizando la expresión en fagos. Métodos adicionales de selección de proteínas de unión específica se describen en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,498,538, 5,432,018, y WO 98/15833.

[0338] Los métodos de generación de bibliotecas de péptidos y cribado de estas bibliotecas también se describen en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,723,286, 5,432,018, 5,580,717, 5,427,908, 5,498,530, 5,770,434, 5,734,018, 5,698,426, 5,763,192, y 5,723,323.

O. Moléculas orgánicas de unión a IL-17A/F

[0339] Las moléculas orgánicas de unión a IL-17A/F son moléculas orgánicas diferentes de oligopéptidos o anticuerpos tal como se definen aquí, que se unen, preferiblemente específicamente, a un polipéptido IL-17A/F tal como se describe en el presente documento. Las moléculas orgánicas de unión a IL-17A/F se pueden identificar y sintetizar químicamente utilizando metodología conocida (véase, por ejemplo, Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas de unión a IL-17A/F tienen habitualmente menos de aproximadamente 2000 daltons de tamaño, alternativamente menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 ó 200 daltons de tamaño, donde dichas moléculas orgánicas que son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido IL-17A/F tal como se describe en el presente documento, se pueden identificar sin una gran experimentación utilizando técnicas conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de moléculas orgánicas para moléculas que son capaces de unirse a un polipéptido diana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas de unión a IL-17A/F pueden ser, por ejemplo, aldehídos, cetonas, oximas, hidrazonas, semicarbazonas, carbazidas, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, hidrazinas N-sustituidas, hidrazidas, alcoholes, éteres, tioles, tioéteres, disulfuros, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, ureas, carbamatos, carbonatos, cetales, tiocetales, acetales, tioacetales, haluros de arilo, sulfonatos de arilo, haluros de alquilo, sulfonatos de alquilo, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, anilinas, alquenos, alquinos, dioles, amino alcoholes, oxazolidinas, oxazolininas, tiazolidinas, tiazolininas, enaminas, sulfonamidas, epóxidos, aziridinas, isocianatos, cloruros de sulfonilo, compuestos diazo, cloruros de ácido o similares.

P. Cribado de anticuerpos anti-IL-17A/F, oligopéptidos de unión a IL-17A/F y moléculas orgánicas de unión a IL-17A/F con propiedades deseadas

5 **[0340]** Las técnicas para generar anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas que se unen a polipéptidos IL-17A/F se han descrito anteriormente. Se pueden seleccionar adicionalmente anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas con ciertas características biológicas, según se desee.

10 **[0341]** Los efectos inhibidores del crecimiento de un anticuerpo anti-IL-17A/F de la invención se pueden valorar mediante los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando células que expresan un polipéptido IL-17A/F endógenamente o tras la transfección con el gen de IL-17A/F. Por ejemplo, las líneas de células tumorales y las células transfectadas con IL-17A/F apropiadas se pueden tratar con un anticuerpo monoclonal anti-IL-17A/F, oligopéptido u otra molécula orgánica de la invención a varias concentraciones durante unos días (por ejemplo, 2-7 días) y se pueden teñir con violeta cristal o MTT o analizarse mediante algún otro ensayo colorimétrico. Otro método de medición de la proliferación sería mediante la comparación de la captación de ³H-timidina por las células tratadas en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-IL-17A/F, oligopéptido de unión a IL-17A/F o molécula orgánica de unión a IL-17A/F de la invención. Después del tratamiento, las células se recogen y se cuantifica la cantidad de radioactividad incorporada en el ADN en un contador de centelleo. Los controles positivos apropiados incluyen el tratamiento de una línea celular seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento conocido por inhibir el crecimiento de esa línea celular. La inhibición del crecimiento de las células tumorales *in vivo* se puede determinar de varias maneras conocidas en la técnica. Preferiblemente, la célula tumoral es la que sobreexpresa un polipéptido IL-17A/F. Preferiblemente, el anticuerpo anti-IL-17A/F, oligopéptido de unión a IL-17A/F o molécula orgánica de unión a IL-17A/F inhibirán la proliferación celular de una célula tumoral que expresa IL-17A/F *in vitro* o *in vivo* en aproximadamente 25-100% en comparación con la célula tumoral no tratada, más preferiblemente, en aproximadamente 30-100%, e incluso más preferiblemente en aproximadamente 50-100% ó 70-100%, en una realización, a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. La inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti-IL-17A/F de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da lugar a la reducción del tamaño tumoral o la reducción de la proliferación del tumor dentro de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferiblemente dentro de aproximadamente 5 a 30 días.

35 **[0342]** Para seleccionar un anticuerpo anti-IL-17A/F, oligopéptido de unión a IL-17A/F o molécula orgánica de unión a IL-17A/F que inducen la muerte celular, se pueden evaluar la pérdida de integridad de la membrana indicada mediante, por ejemplo, la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano o 7AAD en relación al control. Se puede realizar un ensayo de captación de PI en ausencia de complemento y células efectoras inmunes. Las células tumorales que expresan el polipéptido IL-17A/F se incuban con medio solo o medio que contiene el anticuerpo anti-IL-17A/F (por ejemplo, a aproximadamente 10 µg/ml), un oligopéptido de unión a IL-17A/F o una molécula orgánica de unión a IL-17A/F apropiados. Las células se incuban durante un periodo de 3 días. Tras cada tratamiento, las células se lavan y se fraccionan en tubos 12x 75 con tapón colador de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la extracción de grupos de células. A continuación, los tubos reciben PI (10 µg/ml). Las muestras se pueden analizar utilizando un citómetro de flujo FACSCAN® y el software FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Los anticuerpos anti-IL-17A/F, oligopéptidos de unión a IL-17A/F o moléculas de unión a IL-17A/F que inducen estadísticamente niveles significativos de la muerte celular determinada mediante la captación de PI se pueden seleccionar como anticuerpos anti-IL-17A/F, oligopéptidos de unión a IL-17A/F o moléculas orgánicas de unión a IL-17A/F inductoras de la muerte celular.

50 **[0343]** Para cribar anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas que se unen a un epítipo en un polipéptido IL-17A/F unido por un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina, tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Este ensayo se puede utilizar para determinar si un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica de prueba se une al mismo sitio o epítipo que un anticuerpo anti-IL17A/F conocido. Alternativamente, o adicionalmente, la localización de epítopos se puede realizar mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de anticuerpos se puede mutagenizar, tal como mediante rastreo de alanina, para identificar residuos de contacto. El anticuerpo mutante se analiza inicialmente por la unión con el anticuerpo policlonal para asegurar el plegamiento correcto. En un método diferente, se pueden utilizar péptidos correspondientes a diferentes regiones de un polipéptido IL-17A/F en ensayos de competición con los anticuerpos de prueba o con un anticuerpo de prueba y un anticuerpo con un epítipo caracterizado o conocido.

60 Q. Composiciones farmacéuticas

[0344] Las moléculas IL-17A/F activas de la invención (a saber anticuerpos anti-IL-17A/F, tal como se define en las reivindicaciones), así como otras moléculas identificadas en los ensayos de cribado dados a conocer anteriormente,

pueden administrarse para el tratamiento de enfermedades relacionados con el sistema inmunitario, en la forma de composiciones farmacéuticas. Se preparan formulaciones terapéuticas del anticuerpo de IL-17A/F activo, para el almacenamiento mediante la mezcla de la molécula activa que presenta el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol, A., editor, 1980), en la forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables resultan no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil-amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol; alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metilparabén o propilparabén; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína) y/o surfactantes no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG)).

[0345] Los compuestos identificados por los ensayos de cribado descritos en el presente documento pueden formularse de una manera análoga, utilizando técnicas estándares bien conocidas de la técnica.

[0346] También pueden utilizarse lipofecciones o liposomas para administrar la molécula IL-17A/F en las células. En el caso de que se utilicen fragmentos de anticuerpo, resulta preferente el fragmento inhibidor más pequeño que se una específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas peptídicas que conserven la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Estos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893, 1993).

[0347] La formulación de la presente descripción también puede contener más de un compuesto activo según resulte necesario para la indicación particular bajo tratamiento, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no interfieran negativamente entre sí. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente citotóxico, citoquina o agente inhibidor del crecimiento. Estas moléculas se encuentran convenientemente presentes en combinación en cantidades que resultan eficaces para el fin pretendido.

[0348] Las moléculas IL-17A/F activas también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervado o mediante polimerización interfacial, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidal (por ejemplo liposomas, microsferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Estas técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol, A., editor, 1980.

[0349] Las formulaciones destinadas a la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril.

[0350] Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida para las moléculas IL-17A/F. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, encontrándose las matrices en la forma de productos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(alcohol vinílico), poliláctidos (patente de Estados Unidos nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, copolímeros no degradables de etileno-acetato de vinilo, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico, tales como LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. En el caso de que los anticuerpos encapsulados permanezcan en el cuerpo durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37°C, resultando en una pérdida de actividad biológica y en posibles cambios de inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio de tio-disulfuros, puede conseguirse la estabilización modificando los residuos sulfhidrido, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados y desarrollando composiciones específicas de matriz de polímero.

R. Métodos de tratamiento

[0351] Se contempla que los anticuerpos de la invención y los polipéptidos y otros compuestos activos de la

descripción puedan utilizarse para tratar diversas enfermedades y condiciones relacionadas con el sistema inmunitario, tales como enfermedades mediadas por células T, incluyendo aquéllas caracterizadas por la infiltración de células inflamatorias en un tejido, la estimulación de la proliferación de las células T, la inhibición de la proliferación de las células T, la permeabilidad vascular incrementada o reducida o la inhibición de las mismas.

[0352] Entre las condiciones o trastornos ejemplares que deben tratarse con los polipéptidos, anticuerpos y otros compuestos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la artritis crónica juvenil, la osteoartritis, las espondiloartropatías, la esclerosis sistémica (escleroderma), las miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), el síndrome de Sjögren, la vasculitis sistémica, la sarcoidosis, la anemia hemolítica autoinmunitaria (pancitopenia inmunitaria, hemoglobinuria nocturna paroxística), la trombocitopenia autoinmunitaria (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por el sistema inmunitario), la tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), la diabetes mellitus, la enfermedad renal mediada por el sistema inmunitario (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), las enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, tales como la esclerosis múltiple, la polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré y la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares tales como la hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), la hepatitis activa crónica autoinmunitaria, la cirrosis biliar primaria, la hepatitis granulomatosa y la colangitis esclerosante, la enfermedad intestinal inflamatoria (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), la enteropatía sensible al gluten y la enfermedad de Whipple, las enfermedades de la piel autoinmunitarias o mediadas inmunológicamente, incluyendo las enfermedades bullosas de la piel, el eritema multiforme y la dermatitis por contacto, la soriasis, las enfermedades alérgicas tales como el asma, la rinitis alérgica, la dermatitis atópica, la hipersensibilidad alimentaria y la urticaria, las enfermedades inmunitarias de los pulmones, tales como las neumonías eosinofílicas, la fibrosis pulmonar idiopática y la neumonitis de hipersensibilidad, las enfermedades asociadas al trasplante, incluyendo el rechazo del injerto y la enfermedad del injerto contra el huésped.

[0353] En el lupus eritematoso sistémico, el mediador central de la enfermedad es la producción de anticuerpos autorreactivos contra autoproteínas/tejidos y la generación posterior de inflamación mediada por el sistema inmunitario. Los anticuerpos median directa o indirectamente en la lesión de los tejidos. Aunque no se ha demostrado que los linfocitos T se encuentren directamente implicados en el daño de los tejidos, los linfocitos T resultan necesarios para el desarrollo de los anticuerpos autorreactivos. La génesis de la enfermedad, de esta manera, depende de los linfocitos T. Resultan afectados clínicamente múltiples órganos y sistemas, incluyendo riñón, pulmón, sistema musculoesquelético, mucocutáneo, ojo, sistema nervioso central, sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal, médula ósea y sangre.

[0354] La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad inflamatoria autoinmunitaria sistémica crónica que principalmente implica la membrana sinovial de múltiples articulaciones, con daños resultantes en el cartílago articular. La patogénesis depende de los linfocitos T y se asocia a la producción de factores reumatoides, autoanticuerpos dirigidos contra auto-IgG, con la formación resultante de complejos inmunitarios que alcanzan niveles elevados en el líquido articular y en la sangre. Estos complejos en la articulación pueden inducir la infiltración marcada de linfocitos y monocitos en el sinovio y cambios sinoviales marcados posteriores; el espacio/líquido articular se infiltra con células similares, con la adición de numerosos neutrófilos. Los tejidos afectados principalmente son las articulaciones, con frecuencia en un patrón simétrico. Sin embargo, también se produce enfermedad extraarticular en dos formas principales. Una forma es el desarrollo de lesiones extraarticulares con enfermedad articular progresiva continua y lesiones típicas de fibrosis pulmonar, vasculitis y úlceras cutáneas. La segunda forma de enfermedad extraarticular es el denominado síndrome de Felty, que se produce tarde durante el curso de la enfermedad de la RA, en ocasiones tras convertirse la enfermedad articular en quiescente, e implica la presencia de neutropenia, trombocitopenia y esplenomegalia. Esto puede verse acompañado por vasculitis en múltiples órganos, con formación de infartos, úlceras de la piel y gangrena. Los pacientes con frecuencia también desarrollan nódulos reumatoides en el tejido subcutáneo que recubre las articulaciones afectadas; los nódulos en estadio tardío presentan centros necróticos circundados por un infiltrado celular inflamatorio mixto. Entre otras manifestaciones que pueden producirse en la RA se incluyen: pericarditis, pleuritis, arteritis coronaria, neumonitis intestinal con fibrosis pulmonar, queratoconjuntivitis seca y nódulos reumatoides.

[0355] La artritis crónica juvenil es una enfermedad inflamatoria idiopática crónica que se inicia con frecuencia a edades inferiores a 16 años. El fenotipo de la misma presenta algunas similitudes con la RA; algunos pacientes positivos para el factor reumatoide se clasifican como artritis reumatoide juvenil. La enfermedad se subclasifica en tres categorías principales: pauciarticular, poliarticular y sistémica. La artritis puede ser severa y típicamente es destructiva y conduce a la anquilosis articular y a retraso en el crecimiento. Entre otras investigaciones pueden incluirse uveítis anterior crónica y amiloidosis sistémica.

[0356] Las espondiloartropatías son un grupo de trastornos con algunas características clínicas comunes y la asociación común con la expresión del producto génico HLA-B27. Entre los trastornos se incluyen: espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter (artritis reactiva), artritis asociada a enfermedad intestinal inflamatoria, espondilitis asociada a soriasis, espondiloartropatía de aparición juvenil y espondiloartropatía no diferenciada. Entre las características distintivas se incluyen sacroileitis con o sin espondilitis, artritis asimétrica inflamatoria, asociación con

HLA-B27 (un alelo definido serológicamente del locus HLA-B del MHC de clase I), inflamación ocular y ausencia de autoanticuerpos asociados a otra enfermedad reumatoide. Las células que se han implicado más como clave para la inducción de la enfermedad son los linfocitos T CD8+, células con diana en los antígenos presentados por las moléculas del MHC de clase I. Las células T CD8+ pueden reaccionar contra el alelo HLA-B27 del MHC de clase I como si fuese un péptido foráneo expresado por las moléculas del MHC de clase I. Se ha planteado la hipótesis de que un epítipo de HLA-B27 podría imitar un epítipo antigénico bacteriano u otro epítipo antigénico microbiano y de esta manera inducir la respuesta de las células T CD8+.

[0357] La esclerosis sistémica (escleroderma) presenta una etiología desconocida. Una característica distintiva de la enfermedad es la induración de la piel; probablemente inducida por un proceso inflamatorio activo. El escleroderma puede estar localizado o ser sistémico; las lesiones vasculares son comunes y las lesiones de las células endoteliales en la microvasculatura son un suceso temprano e importante en el desarrollo de la esclerosis sistémica; la lesión vascular puede encontrarse mediada por el sistema inmunitario. Se infiere una base inmunitaria por la presencia de infiltrados de células mononucleares en las lesiones cutáneas y por la presencia de anticuerpos antinucleares en muchos pacientes. ICAM-1 con frecuencia se encuentra regulada positivamente sobre la superficie de los fibroblastos en lesiones de la piel, sugiriendo que la interacción de las células T con estas células podría presentar un papel en la patogénesis de la enfermedad. Entre otros órganos implicados se incluyen: el tracto gastrointestinal, resultando la atrofia del músculo liso y la fibrosis en peristalsis/motilidad anormales; riñón: proliferación íntima subendotelial concéntrica que afecta a arterias arqueadas e interlobulares menores, resultando en una reducción del flujo sanguíneo renal cortical y en proteinuria, azotemia e hipertensión; músculo esquelético: atrofia, fibrosis intersticial, inflamación; pulmón: neumonitis intersticial y fibrosis intersticial; y corazón: necrosis de la banda de contracción, cicatrización/fibrosis.

[0358] Las miopatías inflamatorias idiopáticas, incluyendo la dermatomiositis, la polimiositis y otras, son trastornos de inflamación muscular crónica de etiología desconocida que resultan en debilidad muscular. El daño/inflamación muscular con frecuencia es simétrico y progresivo. Se asocian autoanticuerpos a la mayoría de formas. Estos autoanticuerpos específicos de la miositis se dirigen contra, e inhiben, la función de componentes, proteínas y ARNs implicados en la síntesis de las proteínas.

[0359] El síndrome de Sjögren se debe a inflamación mediada por el sistema inmunitario y la posterior destrucción funcional de las glándulas lacrimales y salivares. La enfermedad puede encontrarse asociada, o verse acompañada, de enfermedades inflamatorias del tejido conectivo. La enfermedad se asocia a la producción de autoanticuerpos contra los antígenos Ro y La, ambos complejos pequeños de ARN-proteína. Las lesiones resultan en queratoconjuntivitis seca, xerostomía, incluyendo otras manifestaciones o asociaciones la cirrosis biliar, la neuropatía periférica o sensorial y la púrpura palpable.

[0360] Las vasculitis sistémicas son enfermedades en las que la lesión primaria es la inflamación y el posterior daño a los vasos sanguíneos que resulta en isquemia/necrosis/degeneración de los tejidos alimentados por los vasos afectados y finalmente la disfunción del órgano final en algunos casos. La vasculitis también puede producirse como lesión secundaria o secuela en otras enfermedades mediadas por el sistema inmunitario y la inflamación, tales como la artritis reumatoide, la esclerosis sistémica, etc., particularmente en enfermedades que también se asocian a la formación de complejos inmunitarios. Entre las enfermedades en el grupo de las vasculitis sistémicas primarias se incluyen: vasculitis necrotizante sistémica, poliarteritis nodosa, angiitis alérgica y granulomatosis, poliangiitis, granulomatosis de Wegener, granulomatosis linfomatoide y arteritis de las células gigantes. Entre las vasculitis mixtas se incluyen: síndrome del nódulo linfático mucocutáneo (MLNS o enfermedad de Kawasaki), vasculitis aislada del SNC, enfermedad de Behçet, tromboangiitis obliterans (enfermedad de Buerger) y venulitis necrotizante cutánea. El mecanismo patogénico de la mayoría de los tipos de vasculitis listados se cree que se debe principalmente a la deposición de complejos de inmunoglobulina en la pared del vaso y la posterior inducción de una respuesta inflamatoria a través de ADCC, la activación del complemento, o ambos.

[0361] La sarcoidosis es una condición de etiología desconocida que se caracteriza por la presencia de granulomas epitelioides en prácticamente cualquier tejido del cuerpo; la implicación de los pulmones es la más común. La patogénesis implica la persistencia de macrófagos y células linfoides activados en sitios de la enfermedad, con secuelas crónicas posteriores resultantes de la liberación de productos activos local y sistémicamente por parte de estos tipos celulares.

[0362] La anemia hemolítica autoinmunitaria, incluyendo la anemia hemolítica autoinmunitaria, la pancitopenia inmunitaria y la hemoglobinuria nocturna paroxística, es el resultado de la producción de anticuerpos que reaccionan con antígenos expresados sobre la superficie de los glóbulos rojos (y en algunos casos otras células sanguíneas, incluyendo también las plaquetas) y es un reflejo de la eliminación de aquellas células recubiertas de anticuerpo a través de la lisis mediada por el complemento y/o mecanismos mediados por ADCC/receptor Fc.

[0363] En la trombocitopenia autoinmunitaria, incluyendo la púrpura trombocitopénica, y en la trombocitopenia mediada por el sistema inmunitario en otros contextos clínicos, la destrucción/eliminación de las plaquetas se produce como resultado de la unión de anticuerpo o complemento a las plaquetas y la posterior eliminación mediante

mecanismos mediados por lisis del complemento, ADCC o receptor FC.

[0364] La tiroiditis, incluyendo la enfermedad de Grave, la tiroiditis de Hashimoto, la tiroiditis linfocítica juvenil y la tiroiditis atrófica, son el resultado de una respuesta autoinmunitaria contra los antígenos del tiroides con producción de anticuerpos que reaccionan con proteínas presentes, y con frecuencia específicas de la glándula tiroides. Existen modelos experimentales, incluyendo modelos espontáneos: ratas (ratas BUF y BB) y pollos (cepa de pollos obesos); modelos inducibles: inmunización de animales con tiroglobulina o con antígeno microsómico tiroideo (peroxidasa del tiroides).

[0365] La diabetes mellitus de tipo I o diabetes insulino-dependiente es la destrucción autoinmunitaria de las células de los islotes β pancreáticos: esta destrucción se encuentra mediada por autoanticuerpos y células T autorreactivas. Los anticuerpos de la insulina o del receptor de la insulina también pueden producir el fenotipo de falta de respuesta a la insulina.

[0366] Las enfermedades renales mediadas por el sistema inmunitario, incluyendo la glomerulonefritis y la nefritis túbulointersticial, son el resultado de daños mediados por anticuerpos o linfocitos T del tejido renal, sea directamente como resultado de la producción de anticuerpos autorreactivos o células T contra antígenos renales, o indirectamente como resultado de la deposición de anticuerpos y/o complejos inmunitarios en el riñón que son reactivos contra otros antígenos no renales. De esta manera, otras enfermedades mediadas por el sistema inmunitario que resultan en la formación de complejos inmunitarios también pueden inducir una enfermedad renal mediada por el sistema inmunitario como secuela indirecta. Los mecanismos inmunitarios tanto directos como indirectos resultan en una respuesta inflamatoria que produce/induce el desarrollo de lesiones en los tejidos renales, con la resultante alteración de la función del órgano y en algunos casos la progresión hasta la insuficiencia renal. Pueden encontrarse implicados mecanismos inmunitarios tanto humorales como celulares en la patogénesis de las lesiones.

[0367] Se cree que las enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, incluyendo la esclerosis múltiple, la polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, presentan una base autoinmunitaria y resultan en la desmielinización de los nervios como resultado de los daños causados en oligodendrocitos o directamente en la mielina. En la MS existe evidencia que sugiere que la inducción y progresión de la enfermedad depende de los linfocitos T. La esclerosis múltiple es una enfermedad desmielinizante que depende de los linfocitos T y que presenta un curso de recaída-remisión o un curso progresivo crónico. Sin embargo, la etiología es desconocida: contribuyen las infecciones víricas, la predisposición genética, el ambiente y la autoinmunidad. Las lesiones contienen infiltrados de células microgliales mediadas predominantemente por linfocitos T y macrófagos infiltrantes; los linfocitos T CD4⁺ son el tipo celular predominante en las lesiones. El mecanismo de la muerte de los oligodendrocitos y la desmielinización posterior no es conocido pero es probable que esté controlado por los linfocitos T.

[0368] La enfermedad pulmonar inflamatoria y fibrótica, incluyendo las neumonías eosinofílicas, la fibrosis pulmonar idiopática y la neumonitis por hipersensibilidad pueden implicar una respuesta inmunitaria-inflamatoria desregulada. La inhibición de esa respuesta resultaría beneficiosa terapéuticamente.

[0369] Las enfermedades de la piel autoinmunitarias o mediadas por el sistema inmunitario, incluyendo las enfermedades bullosas de la piel, el eritema multiforme y la dermatitis por contacto, se encuentran medidas por autoanticuerpos, la génesis de las cuales depende de los linfocitos T.

[0370] La soriasis es una enfermedad inflamatoria mediada por linfocitos T. Las lesiones contienen infiltrados de linfocitos T, macrófagos y células procesadoras de antígenos, y algunos neutrófilos.

[0371] Las enfermedades alérgicas, incluyendo el asma, la rinitis alérgica, la dermatitis atópica, la hipersensibilidad alimentaria y la urticaria dependen de los linfocitos T. Estas enfermedades se encuentran predominantemente medidas por inflamación inducida por linfocitos T, inflamación mediada por IgE o una combinación de ambos.

[0372] Las enfermedades asociadas al trasplante, incluyendo el rechazo del injerto y la enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD) dependen de los linfocitos T; la inhibición de la función de los linfocitos T resulta beneficiosa.

[0373] Otras enfermedades en las que la intervención de la respuesta inmunitaria y/o inflamatoria resulta beneficiosa son las enfermedades infecciosas, incluyendo aunque sin limitación, la infección vírica (incluyendo, aunque sin limitación, SIDA, hepatitis A, B, C, D, E y herpes), la infección bacteriana, las infecciones fúngicas y las infecciones protozoarias y parasitarias (las moléculas (o derivados/agonistas) que estimulan la MLR pueden utilizarse terapéuticamente para incrementar la respuesta inmunitaria frente a agentes infecciosos), enfermedades de inmunodeficiencia (moléculas/derivados/agonistas) que estimulan el MLR pueden utilizarse terapéuticamente para incrementar la respuesta inmunitaria para condiciones de inmunodeficiencia heredada, adquirida, infecciosa inducida (tal como en la infección por VIH) o yatrogénica (es decir, derivada de la quimioterapia), y la neoplasia.

[0374] Se ha demostrado que algunos pacientes humanos de cáncer desarrollan una respuesta de anticuerpos y/o de

linfocitos T frente a los antígenos en las células neoplásicas. También se ha demostrado en modelos animales de neoplasia que la intensificación de la respuesta inmunitaria puede resultar en el rechazo o la regresión de ese neoplasma particular. Las moléculas que incrementan la respuesta de linfocitos T en la MLR presentan utilidad en vivo en el incremento de la respuesta inmunitaria frente a la neoplasia. Las moléculas que incrementan la respuesta proliferativa de los linfocitos T en la MLR (o agonistas o anticuerpos de molécula pequeña que afectaban al mismo receptor de manera agonista) pueden utilizarse terapéuticamente para tratar el cáncer. Las moléculas que inhiben la respuesta de linfocitos en la MLR también funcionan *in vivo* durante la neoplasia para suprimir la respuesta inmunitaria frente a un neoplasma; dichas moléculas pueden ser expresadas por las células neoplásicas mismas o la expresión de las moléculas puede ser inducida por el neoplasma en otras células. El antagonismo de dichas moléculas inhibitoras (con anticuerpos, con antagonistas de molécula pequeña o con otros medios) incrementa el rechazo del tumor mediado inmunitariamente.

[0375] Además, la inhibición de moléculas con propiedades proinflamatorias podría resultar terapéuticamente beneficioso en el daño por reperusión, el ictus, el infarto de miocardio, la aterosclerosis, el daño pulmonar agudo, el choque hemorrágico, las quemaduras, la sepsis/choque séptico, la necrosis tubular aguda, la endometriosis, la enfermedad articular degenerativa y la pancreatitis.

Los compuestos, por ejemplo polipéptidos o anticuerpos, se administran en un mamífero, preferentemente un ser humano, según procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa en forma de un bolo o mediante infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o mediante inhalación (intranasal, intrapulmonar). Resulta preferente la administración intravenosa o inhalada de polipéptidos y anticuerpos.

[0376] En la terapia de inmunoadyuvante, pueden combinarse otros regímenes terapéuticos, tales como la administración de un agente anticáncer, con la administración de las proteínas, anticuerpos o compuestos. Por ejemplo, el paciente que debe tratarse con el inmunoadyuvante también puede recibir un agente anticáncer (agente quimioterapéutico) o terapia de radiación. La preparación y programas de dosificación para estos agentes quimioterapéuticos puede realizarse siguiendo las instrucciones del fabricante o según determine empíricamente el experto en la materia. La preparación y programas de dosificación de dicha quimioterapia también se describen en: Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1992. El agente quimioterapéutico puede anteceder o seguir a la administración del inmunoadyuvante o puede proporcionarse simultáneamente al mismo. Además, puede proporcionarse un compuesto antiestrógeno, tal como tamoxifeno, o una antiprogesterona, tal como onapristona, (ver la patente EP nº 616812) en las dosis conocidas de dichas moléculas.

[0377] Puede resultar deseable administrar también anticuerpos contra otros antígenos asociados a enfermedad inmunitaria o a tumor, tales como anticuerpos que se unen a CD20, CD11a, CD18, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4 o factor vascular endotelial (VEGF). Alternativamente, o adicionalmente, pueden coadministrarse en el paciente dos o más anticuerpos que se unen a los mismos antígenos o a dos o más antígenos diferentes dados a conocer en la presente descripción. En ocasiones puede resultar beneficioso administrar también una o más citoquinas en el paciente. En una realización, los polipéptidos IL-17A/F se coadministran con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento puede administrarse en primer lugar, seguido de un polipéptido IL-17A/F. Sin embargo, la administración simultánea o la administración en primer lugar también se encuentra contemplada. Las dosis adecuadas del agente inhibidor del crecimiento son aquellas utilizadas en la actualidad y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el polipéptido IL-17A/F.

[0378] Para el tratamiento o la reducción en la severidad de la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario, la dosis apropiada de un compuesto dependerá del tipo de enfermedad que deba tratarse, tal como se ha definido anteriormente, de la severidad y del curso de la enfermedad, si el agente se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, el historial clínico del paciente y la respuesta al compuesto, y la discreción del médico responsable. El compuesto se administra convenientemente en el paciente en un tiempo o a lo largo de una serie de tratamientos.

[0379] Por ejemplo, dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad, una dosis candidata inicial para administrar en el paciente es aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1 a 20 mg/kg) de polipéptido o anticuerpo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica se encuentra comprendida entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores indicados anteriormente. Para las administraciones repetidas a lo largo de varios días o más tiempo, dependiendo de la condición, el tratamiento se prolonga hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, también pueden resultar útiles otros regímenes de dosis. El progreso de esta terapia de sigue con facilidad mediante técnicas y ensayos convencionales.

S. Artículos de fabricación

[0380] En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales (por ejemplo que comprende una molécula de IL-17A/F) útiles para el diagnóstico o el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y unas instrucciones. Entre los recipientes

adecuados se incluyen, botellas, viales, jeringas y probetas. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales, tales como el vidrio o el plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para diagnosticar o tratar la condición y puede presentar una abertura de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que presenta un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. Unas instrucciones o etiquetas sobre el recipiente o asociado al mismo indican que la composición se utiliza para diagnosticar o tratar la condición seleccionada. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de utilización.

T. Diagnóstico y pronóstico de la enfermedad relacionada con el sistema inmunitario

[0381] Las proteínas de superficie celular, tales como las proteínas que se sobreexpresan en determinadas enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario, son dianas excelentes para fármacos candidatos o para el tratamiento de enfermedades. Las mismas proteínas conjuntamente con proteínas secretadas codificadas por los genes amplificados en los estados patológicos relacionados con el sistema inmunitario encuentran un uso adicional en el diagnóstico y pronóstico de estas enfermedades. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra los productos proteína de genes amplificados en la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide u otra enfermedad relacionados con el sistema inmunitario, pueden utilizarse como agentes de diagnóstico o pronóstico.

[0382] Por ejemplo, los anticuerpos, incluyendo los fragmentos de anticuerpo, pueden utilizarse para detectar cualitativa o cuantitativamente la expresión de proteínas codificadas por genes amplificados o sobreexpresados ("productos génicos marcadores"). El anticuerpo preferentemente está dotado de un marcador detectable, por ejemplo fluorescente, y la unión puede seguirse mediante microscopía óptica, citometría de flujo, fluorimetría u otras técnicas conocidas del sector. Estas técnicas resultan particularmente adecuadas si el gen sobreexpresado codifica una proteína de superficie celular. Estos ensayos de unión se llevan a cabo esencialmente tal como se ha descrito anteriormente.

[0383] La detección *in situ* de la unión de anticuerpos a los productos génicos marcadores puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia o mediante microscopía inmunoelectrónica. Para este fin, se extrae una muestra histológica del paciente y se aplica al mismo un anticuerpo marcado, preferentemente recubriendo con el anticuerpo una muestra biológica. Este procedimiento también permite determinar la distribución del producto génico marcador en el tejido examinado. Resultará evidente para los expertos en la materia que se encuentran fácilmente disponibles una amplia diversidad de procedimientos histológicos para la detección *in situ*.

[0384] Los ejemplos siguientes se ofrecen únicamente a título ilustrativo, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

EJEMPLOS

[0385] Los reactivos disponibles comercialmente a los que se hace referencia en los ejemplos se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. La fuente de las células identificadas en los ejemplos siguientes, y en toda la memoria, por los números de acceso de la ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

EJEMPLO 1

Expresión recombinante de una citoquina IL-17 nueva identificada como IL-17A/F

Transfección de células de riñón 293 humanas con vectores de expresión de ADNc que codifican IL-17 e IL-17F

[0386] Se transfectaron células de riñón 293 humanas con cantidades iguales de plásmidos que codifican los genes IL-17, IL-17C e IL-17F humanos, utilizando un procedimiento de precipitación con fosfato de calcio. Para cada matraz T-150 confluyente a 50-80%, se mezclaron 50 µg de cada plásmido para formar un precipitado para cubrir las células. Un día después de la transfección, se extrajo F12:DMEM 50:50 que contenía FCS al 10%, L-glutamina 5 mM, penicilina-estreptomycin y se substituyó por medio PS24 libre de suero y se cultivó durante cuatro días adicionales. Después de cuatro días, se recogió el medio acondicionado, se centrifugó y se filtró de forma estéril, antes de la purificación.

Purificación de IL-17A/F recombinante

A. Etapas de fraccionamiento inicial 1:

[0387] Se concentraron dos litros y medio de medio acondicionado con IL-17A/F recombinante de cultivos transitorios

de células de riñón 293 humanas y se dializaron contra acetato de sodio 20 mM, pH 5,0, azida sódica 1 mM (tampón A) utilizando una membrana de corte de 10 kilodaltons hasta un volumen de 480 mililitros, a continuación se aplicó a una columna Sepharosa 26/10 HiLoad S de Pharmacia a 6 ml/min. La columna se eluyó con un gradiente lineal hasta tampón B del 100% (acetato de sodio 20 mM, NaCl 1 M, azida sódica 1 mM, pH 5,0) a una velocidad de 1%/minuto con un caudal de 6 ml/min recogiendo fracciones de 12 ml. Se realizó un análisis SDS PAGE en las fracciones recogidas de esta columna. Las proteínas se revelaron con tinción con plata. Los marcadores de peso molecular están marcados para las fracciones 25-37 que contienen gel (figura 2). Las fracciones 31 y 32 contenían una proteína con un peso molecular aparente de aproximadamente 33 kD consistente con IL-17A/F.

B. Purificación de IL-17A/F:

[0388] Se acidificaron cuatro ml de la fracción 32 (figura 2) con ácido trifluoroacético al 0,1%, a continuación se aplicaron a 0,5 ml/min a una columna C6 Vydac equilibrada en ácido trifluoroacético al 0,1% (tampón C) y se eluyó en gradiente hasta 100% de tampón d (ácido trifluoroacético al 0,1% en acetonitrilo al 100%) con un gradiente de tres etapas (0-35% D durante 10 minutos, 35-50% D durante 35 minutos, 50-100% D durante 10 minutos). La figura 2 muestra el cromatógrafo de proteínas eluidas medido a 214 nm y 280 nm. El gradiente en etapas de acetonitrilo se solapa sobre el perfil. Se observó que la concentración de proteína de la fracción 38 fue de 0,536 mg/ml mediante análisis de aminoácidos. Se desarrollaron en esta fracción geles, transferencias y ensayos de secuencia de aminoácidos y actividad.

[0389] Se agruparon la fracción 31 y el volumen restante de la fracción 32, del desarrollo en Sepharose S HiLoad, y se dializaron contra el tampón A durante ocho horas utilizando una membrana de corte de 10 kD y se pasó a través de un filtro de 0,2 micras. Este material se cargó en una columna Mono S equilibrada en Tampón A a un caudal de 1 ml/min y se eluyó con un gradiente de tres etapas hasta 100% de Tampón B (0-30% B durante 10 volúmenes de columna, 30-75% B durante 45 volúmenes de columna, 75-100% B durante 10 volúmenes de columna), recogiendo fracciones de 1 ml. Las fracciones 26-43 se analizaron y se determinaron las concentraciones de proteína mediante análisis de aminoácidos. La concentración de las fracciones 31, 32 y 33 fueron 0,258, 0,359 y 0,291 mg/ml, respectivamente. Se desarrollaron geles, transferencias, ensayos de la secuencia de aminoácidos, espectrometría de masas y ensayos de la actividad principalmente en las fracciones 32 y 33. Las fracciones generadas mediante cromatografía se analizaron por el contenido de IL-17 e IL-17F a través de la utilización de transferencia Western. Se utilizó un µg/ml de anticuerpo monoclonal dirigido contra IL-17 o IL-17F para detectar la presencia de IL-17 o IL-17F en las muestras.

Análisis por espectrometría de masas de IL-17A/F

[0390] Se determinaron la secuencia de aminoácidos y los enlaces disulfuro entre cadenas de IL-17A/F maduro mediante un análisis por espectrometría de masas (véase la figura 4A; polipéptido heterodimérico IL-17A/F mostrado con enlaces disulfuro entre cadenas e intracadenas). Se detectaron dos enlaces disulfuro entre cadenas entre las cadenas polipeptídicas de IL-17F e IL-17 [entre el residuo 47IL-17F y el residuo 129IL-17; y entre el residuo 137IL-17F y el residuo 33IL-17, respectivamente (líneas en negrita en la figura 4A). Además, los dos enlaces disulfuro entre cadenas se forman en cada una de las cadenas polipeptídicas de homodímero de IL-17 [entre los residuos 102 y 152; y entre los residuos 107 a 154] y de IL-17F [entre los residuos 94 y 144; y entre los residuos 99 y 146] (líneas en negro claro en la figura 4A). Los aminoácidos se enumeran en relación con la metionina de iniciación en cada cadena polipeptídica precursora (figura 4A). La Figura 4B muestra un esquema de los fragmentos del péptido IL-17 A/F que contiene enlaces disulfuro entre la cadena de IL-17 e IL-17F que se anticiparía por la digestión del IL-17A/F con tripsina [el fragmento 1 del enlace disulfuro de IL-17A/F se designa como SEQ ID NO:7; el fragmento 2 del enlace disulfuro de IL-17A/F se designa como SEQ IDNO:8, respectivamente]. Los aminoácidos contenidos en estos fragmentos se indican y enumeran en relación con la metionina de iniciación de cada cadena.

[0391] El peso molecular aproximado calculado de estos fragmentos que se observaría mediante espectrometría de masas se muestra en la figura 4B como 3410,58 Da y 2420,05 Da [fragmento 1 y 2 del enlace disulfuro de IL-17A/F IL-17A/F, respectivamente]. Se realizó una localización del péptido con espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF)(figura 4C). Se digirieron 55 pmol de IL-17A/F en un tampón de 400 mM de NaCl, 20 mM de tampón NaOAC, pH 5, durante la noche a 37°C con tripsina de grado secuenciación Promega. Se realizó una espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF) con extracción retrasada en el modo de reflectrón de iones positivos utilizando una matriz de 2',4',6'-trihidroxiacetofenona. El mapa del péptido resultante contenía picos con $[M+H]^+ = 2420,12$ Da para el fragmento 2 y 3410,60 Da para el fragmento 1, consistente con los péptidos unidos por disulfuro (Figura 4C). Se digirió una segunda alícuota de la muestra a pH 8 después de la reducción de enlaces disulfuro con ditiotretol y alquilación de grupos sulfhidrilo con yodoacetamida. El espectro de MALDI-TOF de esta muestra carecía de los picos en cuestión, apoyando su asignación de unión a disulfuro. La muestra no reducida se caracterizó adicionalmente mediante espectrometría de masas de producción de iones con ionización por electrospray con cromatografía líquida (LC-ESI-MS) (Figura 4D). Los cromatogramas de iones representan (de arriba a abajo) el cromatograma de iones totales, cromatograma de iones reconstruidos (RIC) del fragmento 2 de enlace disulfuro de IL-17A/F $[M+2H]^{2+}$, y el fragmento 1 de enlace difulsuro de IL-17A/F $[M+2H]^{3+}$. Se observaron picos consistentes con ambos heterodímeros,

mientras que no se observaron picos por encima del ruido químico básico en las masas observadas de los péptidos homodiméricos, indicando así la ausencia de los homodímeros IL-17 o IL-17F. A continuación, se confirmó la composición de los heterodímeros unidos por disulfuro mediante espectrometría de masas en tándem. La disociación inducida por colisión del precursor cargado doblemente a m/z 1210,9 corresponde al fragmento 2 del enlace disulfuro de IL-17A/F y el precursor cargado tríplemente a m/z 1138,0 corresponde al fragmento 1 del enlace disulfuro de IL-17A/F. En los correspondientes espectros se observaron los picos de los fragmentos de las series b e y predichos.

Cribado de biblioteca de fagos para anticuerpos que se unen a IL-17A/F

[0392] A efectos de identificar los anticuerpos que se unen a IL-17A/F, se cribó una biblioteca de fagos de anticuerpos Fab sintéticos. Se identificaron treinta y cuatro (34) clones independientes que codificaban secuencias de anticuerpo Fab distintos que eran capaces de mediar en la unión a IL-17A/F. La biblioteca de fagos de secuencias de anticuerpo humano se preparó y cribó para Fab específico de antígeno de una manera similar a la descrita previamente (Gerstner, R. B. et al., J. Mol. Biol. 321(5):851-62(2002). Brevemente, se utilizó el anticuerpo monoclonal humanizado 4D5, un anticuerpo anti-HER2, como "andamio" para construir bibliotecas de Fab expresados en fagos. Estos Fab se expresan en el fago de forma monovalente y/o divalente mediante fusión a una cremallera de leucinas homodimerizable. Para generar una diversidad de bibliotecas, se eligió aleatorizar los residuos de CDR de cadena pesada expuestos en la superficie que se halló que eran altamente diversos en la base de datos Kabat de secuencias de anticuerpos naturales y forman un parche contiguo. Además, se utilizó la mutagénesis dirigida de sitio con codones degenerados ajustados para generar una diversidad de aminoácidos que mimetizaban el repertorio natural inmune en cada sitio de CDR. A los primeros dos CDR de cadena pesada, H1 y H2, se permitió una diversidad limitada de la misma longitud que Herceptin, mientras que H3 se diseñó para tener una degeneración elevada con una longitud de 7 a 19. Todos los anticuerpos generados a partir de la selección de la biblioteca inicial tienen la cadena ligera idéntica. Se pueden generar IgG o Fab de longitud completa mediante una clonación de una etapa del dominio variable de cadena pesada en vectores que proporcionan la secuencia de región constante específica de isotipo deseado. Para mejorar adicionalmente la afinidad de los enlazadores de la biblioteca de cadenas pesadas, se puede utilizar una aleatorización de CDR de cadena ligera en una segunda etapa. La secuencia de aminoácidos de la región del dominio variable de las cadenas pesadas que contiene los tres (3) CDR [H1-H3] de Fab que se unen a IL-17A/F se muestran en la figura 6. Se muestra el alineamiento e una región de la secuencia de aminoácidos prevista de 34 clones de Fab que codifican secuencias de cadena pesada del anticuerpo distintas que son capaces de unirse a IL-17A/F. Las tres regiones de CDR de cadena pesada se indican como CDR-H1, CDRH2 y CDR-H3, respectivamente, están sombreadas. Las correspondientes SEQ ID NO para cada clon son las siguientes:

Clon #1 = SEQ ID NO:9; Clon #2 = SEQ ID NO:10; Clon #3 = SEQ ID NO:11; Clon #4 = SEQ ID NO: 12; Clon #5 = SEQ ID NO:13; Clon #6 = SEQ ID NO: 14; Clon #7 = SEQ ID NO:15; Clon #8 = SEQ ID NO: 16; Clon #9 =SEQ ID NO:17; Clon #10 =SEQ ID NO:18; Clon #11 = SEQ ID NO:19; Clon #12 = SEQ ID NO:20; Clon #13 = SEQ ID NO:21; Clon #14 = SEQ ID NO:22; Clon #15 = SEQ ID NO:23; Clon #16 = SEQ ID NO:24; Clon #17 = SEQ ID NO:25; Clon #18 = SEQ ID NO:26; Clon #19 = SEQ ID NO:27; Clon #20 =SEQ ID NO:28; Clon #21 = SEQ ID NO:29; Clon #22 = SEQ ID NO:30; Clon #23 = SEQ ID NO:31; Clon #24 = SEQ ID NO:32; Clon #25 = SEQ ID NO:33; Clon #26 = SEQ ID NO:34; Clon #27 = SEQ ID NO:35; Clon #28 = SEQ ID NO:36; Clon #29 = SEQ ID NO:37; Clon #30 = SEQ ID NO:38; Clon #31 = SEQ ID NO:39; Clon #32 = SEQ ID NO:40; Clon #33 = SEQ ID NO:41; Clon #34 = SEQ ID NO:42, respectivamente.

[0393] Además, las correspondientes secuencias de ADN codificantes para cada uno de los treinta y cuatro (34) clones se muestran en la tabla 7 siguiente (SEQ ID NO:43 a SEQ ID NO:76, respectivamente).

Tabla 7

SEQ ID NO:43:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGATTCCGCTATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
 GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTGGGATTACTCCTTATAGCGGTTATACTGACTATGCCGATAG
 CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
 GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAAAGAGGCCCCGAGGGCTACGACGTC
 GGCTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:44:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGATTCCCTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
 GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTGAAATTTCTCCTCCTGGCGGCGATACTTACTATGCCGATAG
 CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
 GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGCTCGTCTCTGTGGTGGTGGGACGGGGCT
 ATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:45:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAATACTTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
 GGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTGTTATTACTCCTTATGGCGGTGCTACTTACTATGCCGATAG
 CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
 GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAGAGAGTATGTGGAGTAAGTTCCGAC
 TACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:46:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTTCTGCTATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
 GGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTTATATTACTCCTGATAACGGTGATACTAACTATGCCGATAG
 CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
 GCTTAATAGCTGAGGATACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCGGCCACGGCAACTTCTACGGTACC
 TGGGCGGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:47:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGGTTCTGATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
 GGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTTATATTAATCCTTATGGCGGTTCTACTGACTATGCCGATAG
 CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
 GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGCGTACGAGATGTGGTACGTTATG
 GACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:48:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAATTCCTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
 GGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTGTTATTACTCCTTCTAGCGGTTCTACTTACTATGCCGATAG
 CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
 GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGGTCTTCCCCGACATCGGGGAC
 TGCAGCAACGCCTACTGCTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:49:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAGTACTTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
 GGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTTGGATTTCTCCTTATAGCGGTTATACTGACTATGCCGATAG
 CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
 GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGGTGGGGTGGGGGACTCGTAC
 GCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:50:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGGTTCTTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCCG
 GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTGGGATTTATCCTTATGACGGTTATACTTACTATGCCGATAG
 CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
 GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGGCCGAGGGCCTGTACCAAGTCC
 GGGATCTACGACGCGGGTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:51:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAGTTACTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCCG
 GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTTATCCTGCTGACGGTGCTACTTACTATGCCGATAG
 CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
 GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGGGTCCTACTTCGGGGGCTACGAT
 ATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:52:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAAATGATTCTGATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCCG
 GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTATTATTTATCCTTATGACGGTTATACTTACTATGCCGATAG
 CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
 GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAAGCAACCTGGACAACAACCTTGTTT
 GACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:53:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAAATGGTTACTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCCG
 GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTGATATTAATCCTAATGGCGGTTCTACTAACTATGCCGATAG
 CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
 GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGCCTACCGGTGCGGCGGGCTCGCC
 GACTGGGCGCGGGGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:54:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGGTTCTTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCCG
 GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTATTATTACTCCTTCTGGCGGTAATACTGACTATGCCGATAG
 CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
 GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGGTCTTCGCCGTGTCGACCGCC
 GGCTACCCCTGGGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:55:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATTCTTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTTCTATTACTCCTTATAACGGTAATACTGACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCAGGGGGGAGTCCGACGAGGCCTAC
GCCCGGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:56:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTAGTTCCGATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTACTATTAATCCTGCTAGCGGTTCTACTGACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCGGCCCAACAGCAGCTTCTACGCG
CTCCAGTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:57:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATAATTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTTGGATTCTCCTTATAGCGGTTATACTTACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGACCCTCTTCTACGACAAGGAC
CAGTACTCCTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:58:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTAGTTCTTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTTGGATTCTCCTTATAGCGGTTATACTGACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGGGGCTCCTGCGGTGGGGCTAC
GCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:59:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATAATGGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCC
GGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTTGGATTACTCCTACTAGCGGTTATACTAACTATGCCGATA
GCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAAC
AGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCGACGGGGACACCTGGAAGTGG
ACGCCCCGTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:60:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAATACTTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCC
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTCTCCTTATAGCGGTTATACTGACTATGCCGATAC
CGTCAAGGACCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCGAGATCTTGCTGGACTACGGTTCC
GCGGGCTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:61:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAGTACCTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCC
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTGTTATTACTCCTACTAACGGTTCTACTTACTATGCCGATAC
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCGAGGTGTGGTGGTGGGGCGACGGC
CACGGCTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:62:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTAGTTCTGCTATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTGGGATTACTCCTGCTAGCGGTTATACTTACTATGCCGATAC
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCTCGCCCCGGCGGGGTGTTTCGTGAC
GGCGGGGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:63:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAAAGTACTGATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGGTAGGATTAATCCTTCTGGCGGTTCTACTAACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTACCAGCGCGTACACCACGTGGGCG
GTCGACTGGTTTCATCGGCTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:64:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGGTTACGGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCC
GGGTAAGGGCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTCTCCTTCTAACGGTTATACTTACTATGCCGATA
GCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAAC
AGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTCGCGTCAGCTACTACGTCTACAG
GCACGACTGGGTGAGGGGCTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:65:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATACCTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCCG
GGTAAGGGCCCTGGAATGGGTTGGTGTTATTACTCCTTATGGCGGTTATACTTACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAGACGGGGGGCTTCTTCGATTACTGG
GGTCAA

SEQ ID NO:66:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGATTCTCTATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCCG
GGTAAGGGCCCTGGAATGGGTTGCTTTTATTTATCCTACTAGCGGTTCTACTTACTATGCCAATAGC
GTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACAG
CTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCACGTGCCTCGTACGGGGTGAGCAAGTGGA
CCTTTGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:67:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGGTTACGGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCC
GGGTAAGGGCCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTTCTCCTTCTAACGGTTATACTTACTATGCCGATA
GCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCATACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAAC
AGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTCGCGTCAGCTACTACGTCTACAG
GCACGACTGGGTGAGGGGCTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:68:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGGTACTTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCCG
GGTAAGGGCCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTTCTCCTTATAGCGGTTATACTAACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAGAGGCCCCGCTCCTCGTTGAGCGCG
GACTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:69:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATAATTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCCG
GGTAAGGGCCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTTCTCCTTATAGCGGTTATACTTACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGTCCGGCTTCTCCGCGTGCAAC
ACGCGGGCGTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:70:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATTCTTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCCTGGAATGGGTTGGTTCTATTACTCCTTATAACGGTAATACTGACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCAGGGGGGAGTCCGACGAGGCCTAC
CCCGCGGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:71:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAGTACCGCTATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTACTCCTFATGACGGTTATACTGACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACTAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTACGTGGTTACGCTGGCCTCGGCT
ATGGAACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:72:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGGTAAATGGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCC
GGGTAAGGGCCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTTCTCCTACTAACGGTTCTACTTACTATGCCGATA
GCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAAC
AGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTAGGGTCGACTACCAGGTCTACCA
CGACCGCTTCGAGGAGGGGTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:73:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAAATAGTTATTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCCTGGAATGGGTTGGTTGGATTTCTCCTGATAACGGTGCTACTAACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
GCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTAAGTTCTGGGGCTGGGACTGGGGG
GGTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:74:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGATTCTTATATACACTGGGTGCGTCAGGCCCCG
GGTAAGGGCCCTGGAATGGGTTGGTGATTAATACTCCTACTGACGGTTATACTGACTATGCCGATAG
CGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAACA
CCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTAACCTTGATGTGGTGGGACTCGTCG
GCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:75:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGATTCTGGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCC
 GGGTAAGGGCCCTGGAATGGGTTGGTTTTATTTATCCTAATGCCGGTCTACTTACTATGCCGATA
 GCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAAC
 AGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTATGTCGTGATCGGGTTCTCGTA
 CGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:76:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAAATAGTACCTGGATACACTGGGTGCGTCAGGCCCC
 GGGTAAGGGCCCTGGAATGGGTTGCTTGGATTAATCCTTATAACGGTTCTACTTACTATGCCGATA
 GCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTACCTACAAATGAAC
 AGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAGACTTGTACGACTACGACATCGG
 CTTCGACTACTGGGGTCAA

Ensayos basados en células - IL-17A/F induce la producción de IL-8 e IL-6

- 5 **[0394]** Las fracciones aisladas de la etapa de purificación con Vydac C4 descrita anteriormente (Figura 3) se analizaron por la capacidad de IL-17A/F para inducir la producción de IL-8. Las fracciones se analizaron mediante incubación con células TK-10 durante 24 horas (fracción de 0,033 microlitros/ml de medio de cultivo celular). A continuación, se recogió el medio acondicionado y se realizaron las mediciones de la concentración de IL-8 e IL-6 en cada fracción mediante ELISA. Se halló que la fracción 38 presentaba una actividad robusta. Se halló que la
- 10 concentración de proteína de la fracción 38 era de 0,536 mg/ml mediante el análisis de aminoácidos. Se desarrollaron sobre extra fracción geles, transferencias, secuencias de aminoácidos y actividades de ensayo (figura 3). Alternativamente, la fracción 31 y el volumen restante de la fracción 32, del desarrollo en HiLoad S Sefarosa run, se agruparon y dializaron contra tampón A durante ocho horas utilizando una membrana de corte de 10 kD y se pasaron a través de un filtro de 0,2 micras. Este material se cargó en una columna Mono S equilibrada en Tampón A a un
- 15 caudal de 1 ml/min y se eluyó con un gradiente de tres etapas hasta Tampón B del 100% (0-30% B durante 10 volúmenes de columna, 30-75% B durante 45 volúmenes de columna, 75-100% B durante 10 volúmenes de columna), recogiendo 1 ml/fracción. Las fracciones 26-43 se analizaron y se determinaron las concentraciones de proteína mediante análisis de aminoácidos. Se identificó IL-17A/F pura en las fracciones 31-33 como una proteína única con peso molecular aparente de 30-35 kD. Las concentraciones de las fracciones 31, 32 y 33 fueron 0,258, 0,359 y 0,291
- 20 mg/ml respectivamente. Los geles y el análisis de la secuencia de la proteína mostraron que este material era idéntico a IL-17A/F purificado por la columna C4 (anterior). Las curvas de dosis-respuesta que comparan la inducción de IL-8 e IL-6 por IL-17A/F, IL-17 e IL-17F se muestran en la figura 5. IL-17A/F, IL-17 e IL-17F se incubaron con células TK-10 en las concentraciones indicadas durante 24 horas. El medio acondicionado con TK-10 se recogió y analizó mediante ELISA de IL-8 y ELISA de IL-6.
- 25

Discusión

- [0395]** La coexpresión de ARNm para IL-17 e IL-17F conduce a la secreción de una nueva especie de proteína que es capaz de unirse a ciertos anticuerpos que son capaces de unirse a IL-17 y a ciertos anticuerpos que son capaces
- 30 de unirse a IL-17F. Esta nueva especie de proteína se designa aquí como la interleuquina-17A/F(IL-17A/F). Esta especie no se observa cuando se producen células 293 de riñón humano para expresar IL-17 o IL-17F en aislamiento. El medio acondicionado de las células transfectadas se inmunoprecipitó (IP) utilizando anticuerpos que son capaces de reconocer IL-17 (carriles 1-5) o IL-17F (carriles 6-10), tal como se muestra en la figura 1A y la figura 1B. Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron a continuación mediante análisis de transferencia Western y se transfirieron con anticuerpos para IL-17 (figura 1A) o IL-17F (Figura 1B). La detección de IL-17A/F se indica en el carril
- 35 8 de la figura 1A y en el carril 3 de la figura 1B por la presencia de IL-17 en un complejo dimérico con IL-17F. El peso molecular de esta especie, determinado mediante SDS-PAGE no reductora, es de aproximadamente 30-35 kD, consistente con la especie comprendida de una molécula de IL-17 y una molécula de IL-17F unidas por enlace covalente. La existencia de esta nueva especie (IL-17A/F) también se puede reconocer como proteína de movilidad electroforética que es diferente de la observada cuando se expresan IL-17 o IL-17F en aislamiento. Por tanto, esta
- 40 nueva especie también se puede visualizar sin la utilización de anticuerpos a través de la utilización de otros métodos de detección de proteínas, tales como técnicas convencionales de tinción de proteínas.

[0396] La existencia de una nueva especie de proteína producida mediante la coexpresión de IL-17 e IL-17F también se observó mediante la separación de las proteínas secretadas presentes en medios acondicionados con cromatografía de fase inversa. La comparación de las fracciones proteicas observadas de las proteínas secretadas producidas por células que coexpresan IL-17 e IL-17F con los patrones observados con células que producen IL-17 o IL-17F reveló la presencia de una especie de proteína adicional. Esta especie de proteína, IL-17A/F, se purificó y aisló hasta homogeneidad mediante cromatografía en columna (Figuras 2 y 3).

[0397] La proteína purificada se desarrolló como una única banda de aproximadamente 30-35 kD determinada mediante SDS-PAGE reductora (Figura 3A). Sin embargo, bajo condiciones reductoras se revelaron dos bandas claramente distintas con un peso molecular aparente de aproximadamente 15-18 kD (no mostrado). De este modo, IL-17A/F es un dímero covalente. Un medio independiente de valoración de la composición de la nueva proteína, el análisis de la secuencia de péptidos N-terminal, también indicó claramente que la IL-17A/F aislada contiene los péptidos IL-17 e IL-17F (Figura 3B). Las secuencias de péptidos detectadas son idénticas a la secuencia contenida en el extremo N-terminal de IL-17 e IL-17F (Figura 3C). El análisis de transferencia Western indicó que esta especie de proteína es también capaz de interactuar con un anticuerpo que es capaz de unirse a IL-17 y con un anticuerpo que es capaz de unirse a IL-17F. Cada una de estas observaciones y el peso molecular distinto de la especie de proteína aislada nueva sugieren que la proteína IL-17A/F aislada es una nueva especie de proteína comprendida de una asociación covalente de IL-17 e IL-17F.

[0398] La existencia y localización de los enlaces disulfuro que unen las cadenas de IL-17 e IL-17F de IL-17A/F se caracterizaron adicionalmente mediante la utilización de espectrometría de masas. La posición de los enlaces disulfuro en IL-17A/F se muestra en la figura 4A esquemática. Dos enlaces disulfuro entre cadenas unen las cadenas de IL-17 e IL-17F en IL-17A/F. Se esperaba que la digestión de IL-17A/F con tripsina produjera dos fragmentos peptídicos diferentes que contienen los enlaces disulfuro entre cadenas (fragmentos 1 y 2 del enlace disulfuro de IL-17A/F; SEQ ID NOs:7 y 8, respectivamente). Estos péptidos se muestran esquemáticamente (figura 4B) junto con el respectivo peso molecular previsto. Estos péptidos se observaron mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF) (Figura 4C) y mediante espectrometría de masas de producción de iones con ionización por electrospray con cromatografía líquida (LC-ESI-MS) (Figura 4D). Los máximos de los péptidos correspondientes a homodímeros de IL-17 o IL-17F no se detectaron, indicando que el IL-17A/F purificado estaba comprendido de heterodímeros covalentes de cadenas de IL-17 e IL-17F y no contenían niveles detectables de homodímeros de IL-17 o IL-17F.

[0399] Además, se han identificado anticuerpos que se unen a IL-17A/F mediante el cribado de una biblioteca de fagos de anticuerpos de Fab sintéticos. Se identificaron treinta y cuatro (34) clones independientes que codificaban secuencias del anticuerpo Fab distintos que eran capaces de mediar la unión a IL-17A/F. La secuencia de aminoácidos de la región del dominio variable de las cadenas pesadas que contiene las tres (3) CDR [H1-H3] de Fab que se unen a IL-17A/F se muestran en la figura 6. Se muestra la alineación de una región de la secuencia de aminoácidos prevista de 34 clones de Fab que codifican secuencias de cadena pesada de anticuerpo distintas que son capaces de unirse a IL-17A/F. Las tres regiones CDR de cadena pesada indicadas como CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, respectivamente, están destacadas en amarillo. Las secuencias de aminoácidos correspondientes para cada uno de los treinta y cuatro (34) clones se identifican como SEQ ID NOs:9-42. Además, las secuencias de ADN codificantes correspondientes para cada uno de los treinta y cuatro (34) clones identificados se muestran en la tabla 7 siguiente (SEQ ID NO:43 a SEQ ID NO:76, respectivamente). De este modo, se han identificado anticuerpos específicos que se unen selectivamente al nuevo complejo heterodimérico de IL-17A/F que puede servir para modular la actividad de la actividad de esta nueva citoquina.

[0400] Se analizó IL-17A/F por la capacidad de estimular una respuesta proinflamatoria utilizando la línea celular de riñón humano TK-10 (figura 5). Esta línea celular responde a IL-17 e IL-17F mediante la producción de IL-8. IL-17A/F también indujo de manera robusta la producción de IL-8 en esta línea celular (Figura 5A). De manera destacada, se observó que IL-17A/F tenía una potencia única que difiere de la de IL-17 o IL-17F. La diferencia en la actividad difiere de IL-17 e IL-17F en aproximadamente un orden de magnitud en cada caso. La actividad sustancialmente superior de IL-17A/F que de IL-17F en este ensayo sugiere que IL-17A/F puede comprender un componente crítico de la actividad de citoquina resultante del producto génico de IL-17F. Esta potencia única puede permitir que la molécula posea una gama distintas de acciones in vivo. IL-17A/F también indujo la producción de IL-6 a partir de esta línea celular (Figura 5B). Adicionalmente, es probable que IL-17A/F pueda poseer características adicionales no presentes en IL-17 o IL-17F como resultado de su nueva composición heterodimérica que puedan alterar la cinética y la utilización de subunidades de receptor in vivo, dando lugar a consecuencias biológicas únicas.

EJEMPLO 2

Identificación de una nueva citoquina IL-17 producida en células T humanas activadas

[0401] En el presente documento se describe una nueva citoquina IL-17 humana (identificada aquí como IL-17A/F humana) producida de forma natural en células de linfocitos T humanas activadas. Se realizó el aislamiento y

activación de células de linfocitos T humanas y se detectó la producción de IL-17A/F y se midió cuantitativamente mediante ELISA de IL-17A/F demostrado a continuación:

Aislamiento y activación de células T humanas

[0402] Se diluyó 1:1 sangre humana extraída recientemente heparinizada (0,5 ml/50 cc) de un donante sano normal con solución salina fisiológica, a continuación se recubrió sobre un Medio de Separación de Linfocitos LSM (ICN) y se centrifugó según se recomienda por el fabricante (ICN). Los linfocitos mononucleares recuperados se emplacaron en matraces de cultivo de tejido en RPMI completo (RPMI, FCS al 10%, L-Glutamina 2 mM, Penicilina/Estreptomicina (GIBCO)), durante una hora a 37 grados C para agotar los monocitos. Se centrifugaron los sobrenadantes de cultivo para agrupar las células restantes. A continuación, se aislaron los linfocitos T humanos mediante selección negativa utilizando un lit de aislamiento de células T CD4+ (MACS). Para activar los linfocitos T aislados, se recubrieron matraces de cultivo de tejido con 5 ug/ml de cada uno de anti-CD3 (BD Bioscience) y anti-CD28 (BD Bioscience) en PBS durante la noche a 4°C. Después de extraer el medio de recubrimiento, los linfocitos T humanos aislados se emplacaron en RPMI completo a una densidad aproximada de 2 millones de células por mililitro de medio. Las muestras del medio se recogieron en varios puntos de tiempo después del emplacado y se analizó el IL-17A/F mediante ELISA. Los sobrenadantes de control no activados se recogieron a partir de los sobrenadantes celulares de los matraces no recubiertos con anti-CD3 y anti-CD28.

Medición mediante ELISA de la producción de IL-17A/F humana en células T humanas activadas anti-CD3/anti-CD28

[0403] Se midieron los niveles de IL-17A/F humano mediante ELISA. Se diluyó IL-17 anti-humano de ratón en tampón de recubrimiento (tampón de carbonato de sodio 0,05 M, pH 9,6) y recubrió placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc), durante 12-15 horas a 2-8°C. Todas las etapas posteriores se realizaron a temperatura ambiente. La unión no específica se bloqueó mediante el vaciado de los pocillos y la adición de tampón de bloqueo (PBS, BSA al 0,5%, Proclin 300 10 ppm). Después de 1 hora de incubación, los pocillos se lavaron con tampón de lavado (PBS, Tween20 al 0,05%, Proclin 300 10 ppm). A continuación, se añadieron patrones de referencia y muestras de IL-17A/F humana, diluida en tampón de ensayo (PBS, BSA al 0,5%, Tween20 al 0,05%, Proclin 300 10 ppm). Después de una incubación de 2 horas, los pocillos se lavaron con tampón de lavado. Se añadió IL-17F anti-humano de ratón biotinilada, diluida en tampón de ensayo, y se dejó incubar durante 1 hora. Después de lavar las placas con tampón de lavado, se añadió Estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano picante) (Amersham), diluida en tampón de ensayo, y se dejó incubar durante 1 hora. Después de lavar las placas con tampón de lavado, se añadió la solución de sustrato, TMB (tetra metil benzidina)-Peroxidasa (R & D Systems). El revelado de color se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 2 N. A continuación, las placas se leyeron en un lector de placas de microtitulación (SLT) a 450 nm con la sustracción del blanco a 540 nm. Se utilizó un programa de ajuste por curva de cuatro parámetros para generar una curva estándar y las concentraciones de muestra se derivaron mediante interpolación a partir de la parte lineal de la curva. Se incluyeron IL-17A e IL-17F como controles en el ELISA para ilustrar la especificidad del ensayo para IL-17A/F (Figura 12).

Resultados:

[0404] Los resultados de las mediciones con ELISA de la producción de IL-17A/F se muestran en la figura 11. Estos estudios demuestran la producción de una citoquina IL-17A/F nueva a partir de células de linfocitos T humanos activados anti-CD3/anti-CD28 en comparación con células T humanas no activadas, donde no se detectó producción de IL-17A/F. Estos resultados muestran por primera vez la aparición natural de una nueva citoquina que se produce y libera en respuesta a la activación de linfocitos T humanos. Además, la especificidad del ensayo eLISA se demostró mediante la observación de cantidades casi equivalentes de IL-17A/F en tres muestras (#31-#33) cuando se analizan en paralelo. Se detectaron cantidades negligibles de IL-17A o IL-17F en este ELISA específico de IL-17A/F (Figura 12).

[0405] Los estudios descritos aquí en el ejemplo 1 y 2 establecen que la IL-17A/F humana recombinantes es una nueva citoquina distinguible, diferenciable de IL-17 e IL-17F humanas en la estructura proteica y en ensayos de actividad celular. A través de la utilización de IL-17A/F humana recombinante purificada como patrón, se ha desarrollado un ELISA específico de IL-17AF humano (mostrado en la figura 11). A través de la utilización de este ELISA específico, se detectó la expresión inducida de IL-17A/F humana, confirmando que IL-17A/F se produce de forma natural a partir de células T humanas activadas en un cultivo. Por lo tanto, IL-17A/F es una citoquina nueva distinguible, detectable como producto natural de células T humanas activadas aisladas, cuya forma recombinante se ha caracterizado, en la estructura proteica y los ensayos de base celular, como diferente y diferenciable de citoquinas relacionadas.

[0406] Esta nueva citoquina puede actuar para modular la actividad de IL-17 in vivo, actuando como inhibidor competitivo para unirse a sitios para IL-17 u otras citoquinas relacionadas. IL-17A/F también puede modular la actividad de otras citoquinas relacionadas mediante la subregulación de sitios de unión para sí misma y/o sitios de unión para otras citoquinas relacionadas. IL-17A/F puede mostrar actividad a través de adaptadores intracelulares o moléculas de señalización que actúan para afectar a su propia actividad de señalización o la de otras citoquinas relacionadas. IL-17A/F tiene la capacidad de afectar al emparejamiento de receptores y coreceptores hallados en la

superficie de células o en el compartimento intracelular.

[0407] De este modo, estos estudios proporcionan e identifican un nuevo estimulante inmunitario (es decir, IL-17A/F) que puede reforzar el sistema inmunitario para responder a un antígeno particular que previamente puede no ser inmunológicamente activo. Por tanto, el estimulante inmunitario recientemente identificado tiene importantes aplicaciones clínicas. Se han identificado otros estimulantes inmunitarios conocidos, tales como IL-12. [véase Gubler et al. PNAS 88, 4143 (1991)]. En una prueba reciente de una vacuna contra el cáncer, los investigadores de la University of Chicago and Genetics Institute (Cambridge, MA) se han basado en la actividad estimuladora inmunitaria de IL-12 para el tratamiento del melanoma. [Peterson et al. Journal of Clinical Oncology 21 (12). 2342-48 (2003)]. Extrajeron glóbulos blancos circulantes que transportaban uno o más marcadores de células de melanoma, aislaron el antígeno y los devolvieron a los pacientes. Normalmente, los pacientes no tendrían una respuesta inmunitaria a sus propios antígenos humanos. A continuación, los pacientes se trataron con diferentes dosis de IL-12, un estimulante inmunitario capaz de inducir la proliferación de células T que han sido coestimuladas por células dendríticas. Debido al efecto estimulador inmunitario de IL-12, el tratamiento proporcionaba resultados superiores en comparación con el trabajo anterior, donde se prepararon células dendríticas del propio paciente a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), se trataron con antígenos, a continuación se cultivaron in vitro y se devolvieron al paciente para estimular la respuesta anticancerosa. [Turner et al. J. Exp. Med. 190 (11), 1669-78 (1999)]. De este modo, esta citoquina IL-17A/F nueva o agonistas de la misma, serían por tanto útiles a la práctica como estimulantes inmunitarios. Mientras que se esperaría que moléculas que muestran actividad IL-17A/F (antagonistas) fueran útiles a la práctica cuando se desea una inhibición de la respuesta inmunitaria, tal como en enfermedades autoinmunes.

[0408] De este modo, los anticuerpos para esta nueva citoquina que mimetiza (anticuerpos agonistas) o inhiben (anticuerpos antagonistas) las actividades inmunitarias de IL-17A/F poseerían cualidades terapéuticas. Las moléculas pequeñas que actúan para inhibir la actividad de esta nueva citoquina también tendría potenciales usos terapéuticos.

EJEMPLO 3

Uso de IL-17A/F como sonda de hibridación

[0409] El procedimiento siguiente describe la utilización de una secuencia de nucleótidos codificante de IL-17A/F como sonda de hibridación.

[0410] Se utilizó el ADN que comprendía la secuencia codificante de IL-17A/F de longitud completa o madura tal como se describe en el presente documento como sonda para cribar los ADNs homólogos (tales como aquellos codificantes de variantes naturales de IL-17A/F) en bibliotecas de ADNc de tejido humano o en bibliotecas genómicas de tejido humano.

[0411] La hibridación y el lavado de filtros que contenían cualquiera de los ADN de biblioteca se llevó a cabo bajo las condiciones de elevada astringencia indicadas a continuación. La hibridación de sonda derivada de IL-17A/F marcada radioactivamente con los filtros se llevó a cabo en una solución de formamida al 50%, 5x SSC, SDS al 0,1%, pirofosfato sódico al 0,1%, fosfato sódico 50 mM, pH 6,8, 2x solución de Denhardt y sulfato de dextrano al 10%, a 42°C durante 20 horas. El lavado de los filtros se llevó a cabo en una solución acuosa de 0,1x SSC y SDS al 0,1% a 42°C.

[0412] Los ADNs que presentaban una identidad de secuencia deseada con el ADN codificante del IL-17A/F de secuencia nativa de longitud completa seguidamente pudieron identificarse utilizando técnicas estándares conocidas en el sector.

EJEMPLO 4

Expresión de IL-17A/F en E. Coli

[0413] El presente ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de polipéptidos IL-17A/F mediante expresión recombinante en *E. coli*.

[0414] La secuencia de ADN codificante de un polipéptido IL-17A/F se amplificó inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores debían contener sitios de enzimas de restricción correspondientes a los sitios de enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado. Puede utilizarse una diversidad de vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es pBR322 (derivado de *E. coli*; véase Bolivar *et al.*, Gene 2:95, 1977), que contiene genes para resistencia a la ampicilina y a la tetraciclina. El vector se digiere con enzima de restricción y se desfosforila. Las secuencias amplificadas por PCR seguidamente se ligan en el vector. El vector preferentemente incluirá secuencias que codifican un gen de resistencia a antibiótico, un promotor *trp*, una secuencia líder de poliHis (incluyendo los primeros seis codones STII, la secuencia de poliHis y el sitio de corte de enteroquinasa), la región codificante de polipéptido IL-17A/F, el terminador transcripcional lambda y un gen *argU*.

[0415] A continuación se utilizó la mezcla de unión para transformar una cepa de *E. coli* seleccionada utilizando los

procedimientos descritos en Sambrook *et al.*, *supra*. Se identificaron los transformantes por su capacidad de crecer en placas de LB y seguidamente se seleccionaron las colonias resistentes a antibiótico. El plásmido de ADN puede aislarse y confirmarse mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN.

- 5 **[0416]** Los clones seleccionados pueden cultivarse durante la noche en medio de cultivo líquido, tal como caldo LB suplementado con antibióticos. El cultivo de la noche posteriormente puede utilizarse para inocular un cultivo a mayor escala. A continuación, se cultivan las células hasta una densidad óptica deseada, periodo durante el que se activa el promotor de expresión.
- 10 **[0417]** Tras cultivar las células durante varias horas más, las células pueden recogerse mediante centrifugación. El pélet celular obtenido mediante la centrifugación puede solubilizarse utilizando diversos agentes conocidos de la técnica, y la proteína IL-17A/F solubilizada seguidamente puede purificarse utilizando una columna quelante de metales bajo condiciones que permitan la unión fuerte de la proteína.
- 15 **[0418]** Los polipéptidos IL-17A/F pueden expresarse en *E. coli* en una forma etiquetada con poli-His utilizando el procedimiento siguiente. El ADN codificante de un polipéptido IL-17A/F se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios de enzima de restricción que corresponden a los sitios de enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado y otras secuencias útiles que proporcionan un inicio de traducción eficiente y fiable, la rápida purificación en una columna quelante de metales y la eliminación proteolítica con enteroquinasa. Las secuencias etiquetadas con poli-His amplificadas por PCR seguidamente se ligan en un vector de expresión, que se utiliza para transformar un huésped *E. coli* basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA)lon galE rpoHts(htpRts)clpP(lacIq)). Los transformantes en primer lugar se cultivan en LB que contiene 50 mg/ml de carbenicilina a 30°C bajo agitación hasta alcanzar una D.O.600 de 3 a 5. A continuación, los cultivos se diluyen 50 a 100 veces en medio CRAP (preparado mediante la mezcla de 3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato sódico·2H₂O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de hicasa SF de Sheffield en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucosa al 0,55% (p/v) y MgSO₄ 7 mM) y se cultivan durante aproximadamente 20 a 30 horas a 30°C bajo agitación. Las muestras se extraen para verificar la expresión mediante análisis de SDS-PAGE, y el cultivo base se centrifuga para peletizar las células. Los pélets celulares se congelan hasta el momento de la purificación y replegamiento.
- 20 **[0419]** Se resuspende pasta de *E. coli* procedente de fermentaciones de 0,5 a 1 litro (pélets de 6 a 10 g) en 10 volúmenes (p/v) en tampón de guanidina 7 M, Tris 20 mM, pH 8. Se añaden sulfito sódico sólido y tetratiónato sódico para alcanzar concentraciones finales de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y la solución se agita durante la noche a 4°C. Esta etapa da lugar a una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados mediante sulfitolización. La solución se centrifuga a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman durante 30 minutos. El sobrenadante se diluye con 3 a 5 volúmenes de tampón de columna de quelato metálico (guanidina 6 M, Tris 20 mM, pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micrómetros para clarificar. El extracto clarificado se carga en una columna de quelato metálico Ni-NTA Qiagen de 5 ml equilibrada en el tampón de columna de quelato metálico. La columna se lava con tampón adicional que contenía imidazol 50 mM (Calbiochem, grado Utrol), pH 7,4. La proteína se eluye con tampón que contiene imidazol 250 mM. Las fracciones que contienen la proteína deseada se agrupan y se almacenan a 4°C. La concentración de proteína se estima a partir de su absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción calculado basado en su secuencia de aminoácidos.
- 30 **[0420]** Las proteínas se replegaron mediante dilución de la muestra lentamente en tampón de replegamiento recién preparada consistente en: Tris 20 mM, pH 8,6, NaCl 0,3 M, urea 2,5 M, cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Se seleccionaron los volúmenes de replegamiento de manera que la concentración final de proteína se encontraba entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de replegamiento se agitó suavemente a 4°C durante 12 a 36 horas. La reacción de replegamiento se detuvo mediante la adición de TFA hasta una concentración final de 0,4% (pH de aproximadamente 3). Antes de la purificación adicional de la proteína, la solución se filtró a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se añadió acetonitrilo hasta una concentración final de 2 a 10%. La proteína replegada se cromatografió en una columna de fase inversa Poros R1/H utilizando un tampón móvil de TFA al 0,1% con elución con un gradiente de acetonitrilo de entre 10% y 80%. Se analizaron alícuotas de fracciones con absorbancia A₂₈₀ en geles de SDS-poliacrilamida y las fracciones que contenían proteína replegada homogénea se agruparon. Generalmente, las especies replegadas correctamente de la mayoría de proteínas se eluyeron a las concentraciones más bajas de acetonitrilo debido a que estas especies son las más compactas, con sus interiores hidrofóbicos resguardados de la interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas habitualmente se eluyen a concentraciones de acetonitrilo más altas. Además de separar las formas mal plegadas de las proteínas respecto a la forma deseada, la etapa de fase inversa también elimina la endotoxina de las muestras.
- 45 **[0421]** Las fracciones que contenían el polipéptido IL-17A/F plegado deseado se agrupan y el acetonitrilo se elimina utilizando un flujo suave de nitrógeno dirigido a la solución. Las proteínas se formulan en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro sódico 0,14 M y manitol al 4% mediante diálisis o mediante filtración en gel utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y se filtran a esterilidad.
- 50 **[0421]** Las fracciones que contenían el polipéptido IL-17A/F plegado deseado se agrupan y el acetonitrilo se elimina utilizando un flujo suave de nitrógeno dirigido a la solución. Las proteínas se formulan en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro sódico 0,14 M y manitol al 4% mediante diálisis o mediante filtración en gel utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y se filtran a esterilidad.
- 55 **[0421]** Las fracciones que contenían el polipéptido IL-17A/F plegado deseado se agrupan y el acetonitrilo se elimina utilizando un flujo suave de nitrógeno dirigido a la solución. Las proteínas se formulan en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro sódico 0,14 M y manitol al 4% mediante diálisis o mediante filtración en gel utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y se filtran a esterilidad.
- 60 **[0421]** Las fracciones que contenían el polipéptido IL-17A/F plegado deseado se agrupan y el acetonitrilo se elimina utilizando un flujo suave de nitrógeno dirigido a la solución. Las proteínas se formulan en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro sódico 0,14 M y manitol al 4% mediante diálisis o mediante filtración en gel utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y se filtran a esterilidad.

EJEMPLO 5

Expresión de IL-17A/F en células de mamífero

[0422] El presente ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glicosilada de IL-17A/F mediante expresión recombinante en células de mamífero.

[0423] El vector, pRK5 (ver la patente EP n° 307.247, publicada el 15 de marzo de 1989) se utilizó como vector de expresión. Opcionalmente el ADN de IL-17A/F se liga en pRK5 con enzimas de restricción seleccionados para permitir la inserción del ADN de IL-17A/F utilizando procedimientos de unión tales como los descritos en Sambrook *et al.*, *supra*. El vector resultante se denomina pRK5-IL-17A/F.

[0424] En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC n° CCL 1573) se cultivan hasta la confluencia en placas de cultivo de tejido en medio tal como DMEM suplementado con suero de feto bovino y opcionalmente componentes nutritivos y/o antibióticos. Se mezclaron aproximadamente 10 µg de ADN de pRK5-IL-17A/F con aproximadamente 1 µg de ADN codificante del gen VA de ARN [Thimmappaya *et al.*, Cell 31:543, 1982] y se disolvieron en 500 µl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl₂ 0,227 M. A esta mezcla se añadieron, gota a gota, 500 µl de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO₄ 1,5 mM y se dejó que se formase un precipitado durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspendió y se añadió a las células 293 y se dejó sedimentar durante aproximadamente cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo se eliminó mediante aspiración y se añadieron durante 30 segundos 2 ml de glicerol al 20% en PBS. A continuación, se lavaron las células 293 con medio libre de suero, se añadió medio fresco y las células se incubaron durante aproximadamente 5 días.

[0425] Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones se extrajo el medio de cultivo y se sustituyó por medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contenía 200 µCi/ml de ³⁵S-cisteína y 200 µCi/ml de ³⁵S-metionina. Tras una incubación de 12 horas, se recogió el medio condicionado, se concentró en un filtro de centrífuga y se cargó en un gel de SDS al 15%. El gel procesado puede secarse y exponerse a película durante un periodo de tiempo seleccionado para revelar la presencia de polipéptido IL-17A/F. Los cultivos que contenían células transfectadas pueden someterse a incubación adicional (en medio libre de suero) y el medio se analiza en bioensayos seleccionados.

[0426] En una técnica alternativa, puede introducirse IL-17A/F en células 293 transitoriamente utilizando el procedimiento del sulfato de dextrano, descrito por Sompanyrac *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 12:7575, 1981. Las células 293 se cultivan hasta la densidad máxima en un matraz de agitación y se añadieron 700 µg de ADN de pRK5-IL-17A/F. En primer lugar las células se concentran a partir del matraz de agitación mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano se incuba en el pélet celular durante cuatro horas. Las células se tratan con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejidos y se reintroducen en el matraz de agitación que contiene medio de cultivo de tejidos, 5 µg/ml de insulina bovina y 0,1 µg/ml de transferrina bovina. Tras aproximadamente cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para eliminar las células y residuos. La muestra que contiene IL-17A/F expresado seguidamente puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía de columna.

[0427] En otra realización, los polipéptidos IL-17A/F pueden expresarse en células CHO. El pRK5-IL-17A/F puede transfectarse en células CHO utilizando reactivos conocidos, tales como CaPO₄ o DEAE-dextrano. Tal como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse y el medio puede sustituirse por medio de cultivo (solo) o medio que contiene un marcador radioactivo tal como ³⁵S-metionina. Tras determinar la presencia de polipéptido IL-17A/F, el medio de cultivo puede sustituirse por medio libre de suero. Preferentemente los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días y después se recoge el medio acondicionado. El medio que contiene IL-17A/F expresado seguidamente puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

[0428] También puede expresarse IL-17A/F etiquetado con epítipo en células CHO huésped. El IL-17A/F puede subclonarse fuera del vector pRK5. La inserción de subclón puede someterse a PCR para fusionarlo en el mismo marco de lectura de un epítipo etiqueta seleccionado, tal como una etiqueta poli-his, en un vector de expresión de baculovirus. La inserción de IL-17A/F etiquetado con poli-his seguidamente puede subclonarse en un vector dirigido por SV40 que contiene un marcador de selección, tal como DHFR, para la selección de clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (tal como se ha descrito anteriormente) con el vector dirigido por SV40. El marcaje puede llevarse a cabo, tal como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene IL-17A/F etiquetado con poli-his expresado seguidamente puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como cromatografía de afinidad de Ni²⁺-quelato.

[0429] Los polipéptidos IL-17A/F también pueden expresarse en células CHO y/o COS mediante un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

[0430] La expresión estable en células CHO se lleva a cabo utilizando el procedimiento siguiente. Las proteínas se expresan en forma de un constructo de IgG (inmuno adhesina), en el que las secuencias codificantes para las formas solubles (por ejemplo los dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionan con una secuencia de región constante de IgG1 que contiene los dominios de bisagra CH2 y CH2 y/o una forma etiquetada con poli-His.

[0431] Tras la amplificación por PCR, los ADNs respectivos se subclonan en un vector de expresión CHO utilizando técnicas estándares, tal como se describe en Ausubel *et al.*, Current Protocols of Molecular Biology, unidad 3.16, John Wiley and Sons, 1997. Los vectores de expresión CHO se construyen de manera que presenten sitios de restricción compatibles 5' y 3' del ADN de interés para permitir el transporte lanzadera de los ADNc. El vector utilizado para la expresión en células CHO es tal como se describe en Lucas *et al.*, Nucl. Acids Res. 24:9 (1774-1779), 1996, y utiliza el promotor temprano/potenciador de SV40 para controlar la expresión del ADNc de interés y de la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

[0432] Se introdujeron doce microgramos del ADN plasmídico deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando los reactivos de transfección disponibles comercialmente Superfect® (Qiagen), Dosper® o Eugene® (Boehringer Mannheim). Las células se cultivaron tal como se describe en Lucas *et al.*, *supra*. Se congelaron aproximadamente 3×10^7 células en una ampolla para el crecimiento y producción posteriores, tal como se describe posteriormente.

[0433] Las ampollas que contenían el ADN plasmídico se descongelaron mediante introducción en un baño de agua y se mezclaron mediante centrifugación. El contenido se pipeteó a un tubo de centrífuga que contenía 10 ml de medio y se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se suspendieron en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado a 0,2 µm con suero de feto bovino diafiltrado por 0,2 µm al 5%). A continuación, se prepararon alícuotas de las células en una centrífuga de 100 ml que contenía 90 ml de medio selectivo. Tras 1 a 2 días, las células se transfirieron a una centrífuga de 250 ml llena de 150 ml de medio de crecimiento selectivo y se incubaron a 37°C. Tras 2-3 días adicionales, se sembraron centrífugas de 250 ml, de 500 ml y de 2.000 ml con 3×10^5 células/ml. Se intercambiaron los medios celulares por medios frescos mediante centrifugación y resuspensión en medio de producción. Aunque puede utilizarse cualquier medio adecuado de CHO, en realidad puede utilizarse un medio de producción descrito en la patente US nº 5.122.469, publicada el 16 de junio de 1992. Se sembró un matraz de agitación para producción de 3 litros a una densidad de $1,2 \times 10^6$ células/ml. El día 0, se determinó el pH del número de células. El día 1, se tomaron muestras del matraz y se inició el paso de aire filtrado. El día 2, se tomaron muestras del matraz, se elevó la temperatura hasta 33°C, y se tomaron 30 ml de glucosa 500 g/l y 0,6 ml de antiespumante al 10% (por ejemplo emulsión al 35% de polidimetilsiloxano, Dow Corning 365 emulsión de grado médico). Durante la producción se ajustó el pH según resultase necesario para mantenerlo a aproximadamente 7,2. Tras 10 días, o hasta que la viabilidad había caído por debajo de 70%, se recogió el cultivo celular mediante centrifugación y filtración a través de un filtro de 0,22 µm. El filtrado se almacenó a 4°C o se cargó inmediatamente en columnas para la purificación.

[0434] Para los constructos etiquetados con poli-His, las proteínas se purificaron utilizando una columna Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añadió imidazol al medio condicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio condicionado se bombeó a una columna Ni-NTA de 6 ml equilibrada en Hepes 20 mM, pH 7,4; tampón que contenía NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a un caudal de 4-5 ml/minuto a 4°C. Tras la carga, la columna se lavó con tampón de equilibración adicional y la proteína se eluyó con tampón de equilibración que contenía imidazol 0,25 M. La proteína altamente purificada posteriormente se desaló en un tampón de almacenamiento que contenía Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine de 25 ml (Pharmacia) y se almacenó a -80°C.

[0435] Se purificaron constructos de inmuno adhesina (que contenían Fc) a partir del medio acondicionado de la manera siguiente. El medio acondicionado se bombeó en una columna de proteína A de 5 ml (Pharmacia) que había sido equilibrada en tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 6,8. Tras la carga, la columna se lavó extensivamente con tampón de equilibrio previamente a la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutralizó inmediatamente mediante la recogida de fracciones de 1 ml en tubos que contenían 275 µl de tampón Tris 1 M, pH 9. Posteriormente, la proteína altamente purificada se desaló en tampón de almacenamiento, tal como se ha descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-His. Se evaluó la homogeneidad con geles de SDS-poliacrilamida y mediante secuenciación de aminoácidos N-terminales a través de degradación Edman.

EJEMPLO 6

Expresión de IL-17A/F en levadura

[0436] El procedimiento siguiente describe la expresión recombinante de polipéptidos IL-17A/F en levaduras.

[0437] En primer lugar se construyeron vectores de expresión en levaduras para la producción intracelular o la secreción de IL-17A/F a partir del promotor ADH2/GAPDH. Se insertó ADN codificante del polipéptido IL-17A/F y el promotor en sitios de enzima de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de IL-17A/F. Para la expresión, puede clonarse ADN codificante de IL-17A/F en el plásmido seleccionado, conjuntamente con ADN codificante del promotor ADH2/GAPDH, un péptido de señal nativo de IL-17A/F u otro péptido de señal de mamífero o, por ejemplo, un factor alfa de levadura o secuencia de señal/líder secretora de invertasa y secuencias de unión (en caso necesario) para la expresión de IL-17A/F.

[0438] Las células de levadura, tales como la cepa de levadura AB110, seguidamente pueden transformarse con los plásmidos de expresión indicados anteriormente y cultivarse en medios de fermentación seleccionados. Los sobrenadantes de las levaduras transformadas pueden analizarse mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y separación mediante SDS-PAGE, seguido de tinción de los geles con tinción de azul de Coomassie.

[0439] Posteriormente puede aislarse y purificarse polipéptidos IL-17A/F recombinantes mediante eliminación de las células de levadura del medio de fermentación mediante centrifugación y después concentrando el medio utilizando filtros de cartucho seleccionados. El concentrado que contenía IL-17A/F además puede purificarse utilizando resinas de cromatografía de columna seleccionadas.

EJEMPLO 7

Expresión de IL-17A/F en células de insecto infectadas por Baculovirus

[0440] El procedimiento siguiente describe la expresión recombinante de polipéptidos IL-17A/F en células de insecto infectadas por baculovirus.

[0441] La secuencia codificante de IL-17A/F se fusiona en dirección 5' de un epítipo etiqueta contenido dentro de un vector de expresión de baculovirus. Entre estos epítipos etiqueta se incluyen etiquetas de poli-his y etiquetas de inmunoglobulina (como regiones Fc de IgG). Puede utilizarse una diversidad de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de plásmidos disponibles comercialmente, tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, la secuencia codificante de IL-17A/F o la parte deseada de la secuencia codificante de IL-17A/F, tal como la secuencia codificante del dominio extracelular de una proteína transmembrana o la secuencia codificante de la proteína madura si la proteína es extracelular, se amplifican por PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios de enzima de restricción flanqueantes (seleccionados). A continuación, el producto se digiere con dichos enzimas de restricción seleccionados y se subclona en el vector de expresión.

[0442] Se genera baculovirus recombinantes mediante cotransfección del plásmido anteriormente indicado y ADN de BaculoGold™ (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC nº CRL 1711) utilizando lipofectina (disponible comercialmente de GIBCO-BRL). Tras 4 a 5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se recogen y se utilizan para amplificaciones adicionales. La infección vírica y la expresión de proteínas se llevan a cabo tal como describe O'Reilley *et al.*, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford, Oxford University Press, 1994.

[0443] A continuación, pueden purificarse IL-17A/F etiquetado con poli-his expresado, por ejemplo mediante cromatografía de afinidad de Ni²⁺-quelato de la manera siguiente. Se preparan extractos a partir de células Sf9 infectadas por virus recombinante tal como describen Rupert *et al.*, Nature 362:175-179, 1993. Brevemente, se lavan células Sf9, se resuspenden en tampón de sonicación (25 ml de Hepes, pH 7,9; MgCl₂ 12,5 mM, EDTA 0,1 mM, glicerol al 10%, NP-40 al 0,1%, KCl 0,4 M) y se sonican dos veces durante 20 segundos sobre hielo. Los sonicados se clarifican mediante centrifugación y el sobrenadante se diluye 50 veces en tampón de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. Se prepara una columna de agarosa Ni²⁺-NTA (disponible comercialmente de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml de tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en una columna a un caudal de 0,5 ml por minuto. La columna se lava hasta la línea base de A₂₈₀ con tampón de carga, momento en el que se inicia la recogida de fracciones. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 6,0) que eluye la proteína no específicamente unida. Tras alcanzar nuevamente la línea base de A₂₈₀, la columna se revela con un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un ml y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción de plata o transferencia western con Ni²⁺-NTA conjugado con fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen IL-17A/F etiquetado con His₁₀ eluido se agrupan y se dializan frente al tampón de carga.

[0444] Alternativamente, puede llevarse a cabo la purificación de IL-17A/F etiquetado con IgG (o etiquetado con Fc) utilizando técnicas conocidas de cromatografía, incluyendo, por ejemplo, cromatografía de columna de proteína A o de proteína G.

EJEMPLO 8

Preparación de anticuerpos que se unen a IL-17A/F

[0445] El presente ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unirse específicamente a IL-17A/F.

[0446] Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas de la técnica y se describen, por ejemplo, en Goding, *supra*. Entre los inmunógenos que pueden utilizarse se incluyen polipéptidos IL-17A/F purificados, proteínas de fusión que contienen polipéptidos IL-17A/F, y células que expresan polipéptidos IL-17A/F recombinantes

sobre la superficie celular. La selección del inmunógeno puede ser llevada a cabo por el experto en la materia sin gran experimentación.

[0447] Se inmunizan ratones, tales como Balb/c, con el inmunógeno IL-17A/F emulsionado en adyuvante completo de Freund y reciben inyecciones subcutáneas o intraperitoneales en una cantidad de entre 1 y 100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas de las patas traseras del animal. A continuación, los ratones inmunizados reciben un refuerzo 10 a 12 días después de inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. Después, durante varias semanas, los ratones también pueden recibir un refuerzo con inyecciones de inmunización adicionales. Pueden obtenerse periódicamente muestras de suero de los ratones mediante sangrado retroorbital para el análisis en ensayos ELISA para la detección de anticuerpos anti-IL-17A/F.

[0448] Tras detectar un título de anticuerpos adecuado, los animales "positivos" para los anticuerpos pueden recibir una inyección intravenosa final de IL-17A/F. Tres a cuatro días después, los ratones se sacrifican y se recolectan las células de bazo. A continuación, las células de bazo se fusionan (utilizando polietilenglicol al 35%) con una línea celular de mieloma murino seleccionado, tal como P3X63AgU.1, disponible de ATCC nº CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que después pueden sembrarse en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de las células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células de bazo.

[0449] Las células de hibridoma se criban en una ELISA para la reactividad contra IL-17A/F. La determinación de las células de hibridoma "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra IL-17A/F se encuentra dentro de los conocimientos disponibles de la técnica.

[0450] Las células de hibridoma positivos pueden inyectarse intraperitonealmente en ratones Balb/c singénicos para producir ascitis que contiene los anticuerpos monoclonales anti-IL-17A/F. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse en matraces de cultivo de tejido o matraces giratorios. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en ascitis puede conseguirse utilizando la precipitación con sulfato amónico, seguido de cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede utilizarse la cromatografía de afinidad basada en la unión de anticuerpos a la proteína A o a la proteína G.

EJEMPLO 9

Purificación de polipéptidos IL-17A/F utilizando anticuerpos específicos

[0451] Pueden purificarse polipéptidos IL-17A/F nativos o recombinantes mediante una diversidad de técnicas estándares en el sector de la purificación de proteínas. Por ejemplo, se purifican pro-polipéptido IL-17A/F, polipéptido IL-17A/F maduro o pre-polipéptido IL-17A/F mediante cromatografía de inmunoafinidad utilizando anticuerpos específicos para el polipéptido IL-17A/F de interés. En general, se construye una columna de inmunoafinidad mediante acoplamiento covalente del anticuerpo anti-polipéptido IL-17A/F a una resina cromatográfica activada.

[0452] Se preparan inmunoglobulinas policlonales a partir de sueros inmunitarios mediante precipitación con sulfato amónico o mediante purificación en proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). De manera similar, se preparan anticuerpos monoclonales a partir de fluido ascítico de ratón mediante precipitación con sulfato amónico o cromatografía en proteína A inmovilizada. Se une covalentemente inmunoglobulina parcialmente purificada a una resina cromatográfica tal como SEPHAROSE TM activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea y la resina derivada se lava siguiendo las instrucciones del fabricante.

[0453] Dicha columna de inmunoafinidad se utilizó en la purificación de polipéptido IL-17A/F mediante la preparación de una fracción a partir de células que contenían polipéptido IL-17A/F en una forma soluble. Esta preparación se derivó mediante solubilización de células completas o de una fracción subcelular obtenida mediante centrifugación diferencial mediante la adición de detergente o mediante otros procedimientos bien conocidos de la técnica. Alternativamente, puede secretarse en una cantidad útil en el medio en que se cultivan las células polipéptido IL-17A/F soluble que contiene una secuencia de señal.

[0454] Se pasó una preparación que contenía polipéptido IL-17A/F soluble sobre la columna de inmunoafinidad, y la columna se lavó bajo condiciones que permitían la absorción preferente del polipéptido IL-17A/F (por ejemplo tampones de elevada fuerza iónica en presencia de detergente). A continuación, la columna se eluyó bajo condiciones que rompen la unión de anticuerpo/polipéptido IL-17A/F (por ejemplo un tampón de pH reducido, tal como aproximadamente 2-3, o una concentración elevada de un caótropro, tal como urea o ión tiocianato) y se recogió el polipéptido IL-17A/F.

EJEMPLO 10

Cribado de fármacos

[0455] La presente invención resulta particularmente útil para cribar compuestos mediante la utilización de polipéptidos IL-17A/F o fragmento de unión del mismo en cualquiera de entre una diversidad de técnicas de cribado de fármacos. El polipéptido IL-17A/F o fragmento utilizado en dicho ensayo puede encontrarse libre en solución, fijo a un soporte sólido, sobre una superficie celular o ser intracelular. Un procedimiento de cribado de fármacos utiliza células huésped eucarióticas o procarióticas que se transforman de forma estable con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido IL-17A/F o fragmento. Los fármacos se criban frente a dichas células transformadas en ensayos de unión competitiva. Dichas células, en forma viable o fija, pueden utilizarse para ensayos de unión estándares. Se puede medir, por ejemplo, la formación de complejos entre el polipéptido IL-17A/F o un fragmento y el agente bajo ensayo. Alternativamente, puede examinarse la disminución en formación de complejo entre el polipéptido IL-17A/F y su célula diana o receptores diana causada por el agente bajo ensayo.

[0456] De esta manera, la presente descripción proporciona procedimientos de cribado de fármacos o de cualquier otro agente que puede afectar a la enfermedad o trastorno asociado al polipéptido IL-17A/F. Estos procedimientos comprenden poner en contacto dicho agente con un polipéptido IL-17A/F o fragmento del mismo y someter a ensayo (i) para la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido IL-17A/F o fragmento, o (ii) para la presencia de un complejo entre el polipéptido IL-17A/F o fragmento y la célula, mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. En estos ensayos de unión competitiva, el polipéptido IL-17A/F o fragmento habitualmente se marca. Tras una incubación adecuada, el polipéptido IL-17A/F libre o fragmento se separa del presente en forma unida, y la cantidad de marcaje libre o no acomplexado es una medida de la capacidad del agente particular de unirse a polipéptido IL-17A/F o de interferir con el complejo polipéptido IL-17A/F/célula.

[0457] Otra técnica de cribado de fármacos proporciona el cribado de alto rendimiento para compuestos que presentan una afinidad de unión adecuada a un polipéptido, y se describe en detalle en WO 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. Brevemente, se sintetiza un gran número de diferentes compuestos de ensayo de péptidos pequeños sobre un sustrato sólido, tal como clavos de plástico o alguna otra superficie. Tal como se aplican en un polipéptido IL-17A/F, los compuestos de ensayo de péptidos se hacen reaccionar con polipéptido IL-17A/F y se lavan. El polipéptido IL-17A/F unido se detecta mediante procedimientos bien conocidos de la técnica. El polipéptido IL-17A/F purificado también puede recubrirse directamente sobre placas para la utilización en las técnicas de cribado de fármacos anteriormente indicadas. Además, pueden utilizarse anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre el soporte sólido.

[0458] La presente invención también contempla la utilización de ensayos de cribado competitivo de fármacos en los que anticuerpos neutralizadores capaces de unirse a polipéptido IL-17A/F compiten específicamente con un compuesto de ensayo para la unión al polipéptido IL-17A/F o a fragmentos del mismo. De esta manera, los anticuerpos pueden utilizarse para detectar la presencia de cualquier péptido que comparte uno o más determinantes antigénicos con el polipéptido IL-17A/F.

EJEMPLO 11

Diseño racional de fármacos

[0459] El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales del polipéptido biológicamente activo de interés (es decir de un polipéptido IL-17A/F) o de moléculas pequeñas con las que interaccionan, por ejemplo agonistas, antagonistas o inhibidores. Cualquiera de estos ejemplos puede utilizarse para diseñar fármacos que resultan más activos, o formas estables del polipéptido IL-17A/F o que aumentan o interfieren con la función del polipéptido IL-17A/F *in vivo* (c.f. Hodgson, Bio/Technology 9:19-21, 1991).

[0460] En una estrategia, se determina la estructura tridimensional del polipéptido IL-17A/F, o de un complejo inhibidor-polipéptido IL-17A/F, mediante cristalografía de rayos X, mediante modelado informático, o más habitualmente, mediante una combinación de las dos estrategias. Debe determinarse tanto la forma como las cargas del polipéptido IL-17A/F para elucidar la estructura y para determinar el sitio o sitios activos de la molécula. Con menos frecuencia puede obtenerse información útil sobre la estructura del polipéptido IL-17A/F mediante modelado basado en la estructura de las proteínas homólogas. En ambos casos, se utiliza información estructural relevante para diseñar moléculas análogas de tipo polipéptido IL-17A/F o para identificar inhibidores eficientes. Entre los ejemplos útiles de diseño racional de fármacos pueden incluirse moléculas que presentan una actividad o estabilidad mejoradas tal como muestran Braxton y Wells, Biochemistry 31:7796-7801, 1992, o que actúan como inhibidores, agonistas o antagonistas de péptidos nativos, tal como muestran Athauda *et al.*, J. Biochem. 113:742-746, 1993.

[0461] También resulta posible aislar un anticuerpo específico de diana, seleccionado mediante ensayo funcional, tal como se ha descrito anteriormente, y después resolver su estructura cristalina. Esta estrategia, en principio, proporciona un prefármaco en el que puede basarse el diseño del fármaco posterior. Resulta posible evitar la toda la cristalografía de proteínas mediante la generación de anticuerpos antiidiotípicos (anti-ids) contra un anticuerpo farmacológicamente activo funcional. A modo de imagen especular de una imagen especular, el sitio de unión de los

anti-ids se esperaría que fuese un análogo del receptor original. El anti-id podría utilizarse entonces para identificar y aislar péptidos de bancos de péptidos producidos química o biológicamente. Los péptidos aislados actuarían entonces como el prefármaco.

- 5 **[0462]** En virtud de la presente invención, pueden proporcionarse cantidades suficientes del polipéptido IL-17A/F para llevar a cabo estudios analíticos tales como cristalografía de rayos X. Además, el conocimiento proporcionado por el presente documento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido IL-17A/F proporcionará una guía para aquellos que utilizan técnicas de modelado informático en lugar de la cristalografía de rayos X o adicionalmente a la misma.

10 Listado de secuencias

[0463]

<110> Genentech, Inc.

15 <120> Polipéptidos heterólogos IL-17AF y usos terapéuticos de los mismos

<130> CMD/FP6959886

20 <150> EP10010285,4
<151> 2004-06-02

<150> EP04754234.5
<151> 2004-06-02

25 <150> PCT/US2004/017581
<151> 2004-06-02

<150> US 60/485,599
30 <151> 2003-07-08

<150> US 60/486,457
<151> 2003-07-11

35 <160> 80

<210> 1
<211> 12
<212> PRT

40 <213> Homo sapiens

<220>
<221> No seguro
<222> 10

45 <223> Aminoácido desconocido

<400> 1
Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Xaa Pro Asn
1 5 10

50 <210> 2
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55 <400> 2
Arg Lys Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln
1 5 10

60 <210> 3
<211> 155
<212> PRT
<213> Homo sapiens

65 <400> 3

ES 2 751 414 T5

Met Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Glu Ala Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn
 5 20 25 30
 Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val
 35 40 45
 10 Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro
 50 55 60
 Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn
 65 70 75
 15 Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp
 80 85 90
 Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn
 20 95 100 105
 Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu
 110 115 120
 25 Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu
 125 130 135
 Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile
 140 145 150
 30 Val His His Val Ala
 155
 <210> 4
 35 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 40 Met Thr Val Lys Thr Leu His Gly Pro Ala Met Val Lys Tyr Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Ser Ile Leu Gly Leu Ala Phe Leu Ser Glu Ala Ala Ala
 20 25 30
 45 Arg Lys Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu
 35 40 45
 Ser Cys Pro Pro Val Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Asp Ile Gly
 50 55 60
 Ile Ile Asn Glu Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu
 65 70 75
 55 Ser Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro
 80 85 90
 Asn Arg Tyr Pro Ser Glu Val Val Gln Ala Gln Cys Arg Asn Leu
 95 100 105
 60 Gly Cys Ile Asn Ala Gln Gly Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser
 110 115 120
 Val Pro Ile Gln Gln Glu Thr Leu Val Val Arg Arg Lys His Gln
 125 130 135
 65

Gly Cys Ser Val Ser Phe Gln Leu Glu Lys Val Leu Val Thr Val
140 145 150

5 Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Val Ile His His Val Gln
155 160

<210> 5
<211> 1859
10 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 5
gcaggcacia actcatccat cccagttga ttgaagaaa caacgatgac 50
15 tcttggaag acctcattgg tgcactgct actgctgctg agcctggagg 100
ccatagtga ggcaggaatc acaatccac gaaatccagg atgcccacat 150
20 tctgaggaca agaactccc cggactgtg atgtcaacc tgaacatcca 200
taaccggaat accaatacca atccaaaag gtcctcagat tactacaacc 250
gatccacctc accttgaat ctccaccgca atgaggaccc tgagagatat 300
25 ccctctgtga tctgggaggc aaagtgccgc cacttgggct gcatcaacgc 350
tgatgggaac gtggactacc acatgaactc tgtcccatc cagcaagaga 400
30 tcttggtcct ggcagggag cctccacact gcccacact cttcggctg 450
gagaagatac tgggtccgt gggctgcacc tgtgtcacc cgattgtcca 500
ccatgtggcc taagagctct ggggagccca cactcccaa agcagttaga 550
35 ctatggagag cgcaccagc cctcaggaa cctcatcct tcaaagacag 600
cctcatttg gactaaactc attagagttc ttaaggcagt ttgtccaatt 650
40 aaagcttcag aggtaacact tggccaagat atgagatctg aattacctt 700
ccctcttcc aagaaggaag gttgactga gtaccaattt gcttctgtt 750
tacttttta agggcttaa gttattatg tattaatat gccctgagat 800
45 aacttgggg tataagattc catttaatg aattacacac ttattttgt 850
ttgtctttt aaagaagata agattctggg ctgggaatt ttattattt 900
50 aaaggtaaaa cctgtattt ttgagctat ttaaggatct atttatgtt 950
aagtatttag aaaaaggta aaaagcacta ttatcagttc tgctaggta 1000
aatgtaagat agaattaat ggcagtcaa aattctgag tctttacaac 1050
55 atacggatat agtatttct cctcttgtt tttaaagtt ataacatggc 1100
tgaaaagaaa gattaaacct acttcatat gtattaattt aaattttgca 1150
attgttgag gttttacaag agatacagca agtctaactc tctgttccat 1200
60 taaaccctta taataaaatc cttctgtaat aataaagtt caaaagaaaa 1250
tgttatttg ttctcattaa atgtatttta gcaaactcag ctcttccta 1300
65

ttgggaagag ttatgcaaatt tctctataa gcaaaacaaa gcatgtcttt 1350
gagtaacaat gacctggaaa tacccaaaat tccaagttct cgatttcaca 1400
5 tgccttcaag actgaacacc gactaagggt ttcatactat tagccaatgc 1450
tgtagacaga agcattttga taggaataga gcaaataaga taatggccct 1500
gaggaatggc atgtcattat taaagatcat atggggaaaa tgaaaccctc 1550
10 cccaaaatac aagaagttct gggaggagac attgtctca gactacaatg 1600
tccagttct cccctagact caggcttct ttggagatta agggccctca 1650
15 gagatcaaca gaccaacatt tttctctcc tcaagcaaca ctctagggc 1700
ctggcttctg tctgatcaag gcaccacaca acccagaaag gagctgatgg 1750
ggcagaacga actttaagta tgagaaaagt tcagccaag taaaataaaa 1800
20 actcaatcac attcaattcc agagtagttt caagttcac atcgtaacca 1850
ttttgccc 1859
25 <210> 6
<211> 559
<212> ADN
<213> Homo sapiens
30 <400> 6
caactgcacc tcggttctat cgatagccac cagcgcaaca tgacagtga 50
gacctgcat ggcccagcca tggtaagta ctgtgctg tcgatattgg 100
35 ggcttgctt tctgagtga ggcgcagctc ggaaaatccc caaagtagga 150
catactttt tccaaaagcc tgagagttgc ccgctgtgc caggaggtag 200
tatgaagctt gacattggca tcatcaatga aaaccagcgc gttccatgt 250
40 cacgtaacat cgagagccgc tccacctccc cctggaatta cactgtcact 300
tgggaccca accggtaccc ctggaagtt gtacaggccc agttaggaa 350
45 ctgggctgc atcaatgctc aaggaaagga agacatctcc atgaattccg 400
ttcccatcca gcaagagacc ctggctgccc ggaggaagca ccaaggctgc 450
tctgtttct tccagttgga gaaggtgctg gtgactgtg gctgcacctg 500
50 cgtcacccct gtcattccacc atgtgcagta agaggtgcat atccactcag 550
ctgaagaag 559
55 <210> 7
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens
60 <400> 7
Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu Ser Cys Pro Pro Val
1 5 10 15
Pro Gly Gly Ser Met Lys
65 20

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 8
 His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe Gln Leu Glu Lys
 1 5 10
 10
 <210> 9
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos

 <400> 9
 20 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Ser Ala Ile
 1 5 10 15

 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 20 25 30
 25
 Gly Ile Thr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 30 50 55 60

 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75

 35 Tyr Cys Ala Lys Glu Ala Arg Glu Gly Tyr Asp Val Gly Tyr Ala
 80 85 90

 Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95
 40
 <210> 10
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos

 <400> 10
 50 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Ser Tyr Ile
 1 5 10 15

 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 20 25 30
 55
 Glu Ile Ser Pro Pro Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 60 50 55 60

 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75

 65 Tyr Cys Ala Arg Leu Leu Trp Trp Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr
 105

80 85 90

Trp Gly Gln

5

<210> 11
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> polipéptidos sintéticos

<400> 11

15 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Asn Thr Trp Ile
 1 5 10 15

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 20 25 30

20 Val Ile Thr Pro Tyr Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 25 50 55 60

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75

30 Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Met Trp Ser Lys Phe Asp Tyr Trp Gly
 80 85 90

Gln

35

<210> 12
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> polipéptidos sintéticos

<400> 12

45 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn Ser Ser Ala Ile
 1 5 10 15

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 20 25 30

50 Tyr Ile Thr Pro Asp Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 55 50 55 60

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Ile Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75

60 Tyr Cys Ala Arg Gly His Gly Asn Phe Tyr Gly Thr Trp Ala Ala
 80 85 90

Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95

65

<210> 13
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> polipéptidos sintéticos

<400> 13
 10 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Gly Ser Asp Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 20 25 30
 15 Tyr Ile Asn Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 20 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 25 Tyr Cys Ala Arg Ala Tyr Glu Met Trp Tyr Val Met Asp Tyr Trp
 80 85 90
 Gly Gln

30

<210> 14
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> polipéptidos sintéticos

<400> 14
 40 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Asn Ser Trp Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 20 25 30
 45 Val Ile Thr Pro Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 55 Tyr Cys Ala Arg Glu Val Phe Pro Asp Ile Gly Asp Cys Ser Asn
 80 85 90
 Ala Tyr Cys Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100

60

<210> 15
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 15

5 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Ser Thr Tyr Ile
1 5 10 15

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
20 25 30

10 Trp Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
35 40 45

15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
50 55 60

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
65 70 75

20 Tyr Cys Ala Arg Glu Val Gly Trp Gly Asp Ser Tyr Ala Met Asp
80 85 90

Tyr Trp Gly Gln

25

<210> 16

<211> 99

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 16

35 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Gly Ser Trp Ile
1 5 10 15

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
20 25 30

40 Gly Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
35 40 45

45 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
50 55 60

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
65 70 75

50 Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Glu Gly Leu Tyr Gln Ser Gly Ile Tyr
80 85 90

Asp Ala Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln
95

55

<210> 17

<211> 93

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 17

65 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Ser Tyr Tyr Ile

1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 20 25 30
 5 Trp Ile Tyr Pro Ala Asp Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 10 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 15 Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Phe Gly Gly Tyr Asp Met Asp Tyr
 80 85 90
 Trp Gly Gln
 20 <210> 18
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos
 <400> 18
 30 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn Asp Ser Asp Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 20 25 30
 35 Ile Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 45 Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Leu Asp Asn Asn Leu Phe Asp Tyr Trp
 80 85 90
 Gly Gln
 50 <210> 19
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos
 <400> 19
 60 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn Gly Tyr Trp Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 20 25 30
 65

Asp Ile Asn Pro Asn Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 10 Tyr Cys Ala Arg Ala Tyr Arg Cys Gly Gly Leu Ala Asp Trp Ala
 80 85 90
 Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95
 15 <210> 20
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos
 <400> 20
 25 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Gly Ser Trp Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 20 25 30
 30 Ile Ile Thr Pro Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 40 Tyr Cys Ala Arg Glu Val Phe Ala Val Ser Thr Ala Gly Tyr Pro
 80 85 90
 Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95
 45 <210> 21
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos
 <400> 21
 55 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Asp Ser Trp Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 20 25 30
 60 Ser Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 65

ES 2 751 414 T5

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 5 Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Glu Ser Asp Glu Ala Tyr Ala Ala Val
 80 85 90
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95
 10
 <210> 22
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos
 <400> 22
 20 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Ser Asp Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 20 25 30
 25 Thr Ile Asn Pro Ala Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 30 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 35 Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Asn Ser Ser Phe Tyr Ala Leu Gln Tyr
 80 85 90
 Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95
 40
 <210> 23
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos
 <400> 23
 50 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Asp Asn Tyr Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 20 25 30
 55 Trp Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 60 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 65 Tyr Cys Ala Arg Glu Thr Leu Phe Tyr Asp Lys Asp Gln Tyr Ser

80 85 90
 Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95
 5
 <210> 24
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos
 <400> 24
 15 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Ser Tyr Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 20 20 25 30
 Trp Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 25 35 40 45
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 30 Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Leu Leu Arg Trp Gly Tyr Ala Met Asp
 80 85 90
 Tyr Trp Gly Gln
 35
 <210> 25
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos
 <400> 25
 45 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Ser Ala Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 20 25 30
 Gly Ile Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 60 Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Gly Gly Val Phe Val Asp Gly Gly Val
 80 85 90
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95
 65

<210> 26
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> polipéptidos sintéticos

<400> 26
 10 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Asn Thr Tyr Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 20 25 30
 15 Trp Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 20 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 25 Tyr Cys Ala Arg Glu Ile Leu Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Gly Tyr
 80 85 90
 Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95
 30

<210> 27
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> polipéptidos sintéticos

<400> 27
 40 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Ser Thr Trp Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 20 25 30
 45 Val Ile Thr Pro Thr Asn Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 55 Tyr Cys Ala Arg Glu Val Trp Trp Trp Gly Asp Gly His Gly Tyr
 80 85 90
 Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95
 60

<210> 28
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 28

5 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Ser Ala Ile
1 5 10 15

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
20 25 30

10 Gly Ile Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
35 40 45

15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
50 55 60

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
65 70 75

20 Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Gly Gly Val Phe Val Asp Gly Gly Val
80 85 90

Met Asp Tyr Trp Gly Gln
95

25

<210> 29

<211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 29

35 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn Ser Thr Asp Ile
1 5 10 15

His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
20 25 30

40 Arg Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
35 40 45

45 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
50 55 60

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
65 70 75

50 Tyr Cys Ala Arg Thr Ser Ala Tyr Thr Thr Trp Ala Val Asp Trp
80 85 90

Phe Ile Gly Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100

55

<210> 30

<211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 30

65 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Gly Tyr Gly Ile

1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 20 25 30
 5 Trp Ile Ser Pro Ser Asn Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 10 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 15 Tyr Cys Ala Arg Arg Val Ser Tyr Tyr Val Tyr Arg His Asp Trp
 80 85 90
 Val Arg Gly Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100
 20 <210> 31
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos
 <400> 31
 30 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Asp Thr Trp Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 20 25 30
 35 Val Ile Thr Pro Tyr Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 40 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 45 Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Phe Phe Asp Asp Tyr Trp Gly Gln
 80 85 90
 <210> 32
 <211> 94
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos
 55 <400> 32
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Ser Tyr Ile
 1 5 10 15
 60 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 20 25 30
 Asp Ile Thr Pro Thr Asp Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 65

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 5 65 70 75

Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Met Trp Trp Asp Ser Ser Ala Met Asp
 80 85 90

10 Tyr Trp Gly Gln

<210> 33
 <211> 101
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polipéptidos sintéticos

20 <400> 33
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Gly Tyr Gly Ile
 1 5 10 15

25 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 20 25 30

Trp Ile Ser Pro Ser Asn Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45

30 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Tyr Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 35 65 70 75

Tyr Cys Ala Arg Arg Val Ser Tyr Tyr Val Tyr Arg His Asp Trp
 80 85 90

40 Val Arg Gly Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95 100

<210> 34
 <211> 96
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polipéptidos sintéticos

50 <400> 34
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Gly Thr Tyr Ile
 1 5 10 15

55 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 20 25 30

Trp Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45

60 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 65 70 75

Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Arg Ser Ser Leu Ser Ala Asp Tyr Ala
 80 85 90
 5 Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95
 <210> 35
 <211> 98
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos
 15 <400> 35
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Asp Asn Tyr Ile
 1 5 10 15
 20 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 20 25 30
 Trp Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 25 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Gly Phe Ser Ala Cys Asn Thr Arg Ala
 80 85 90
 35 Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95
 <210> 36
 <211> 96
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos
 45 <400> 36
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Asp Ser Trp Ile
 1 5 10 15
 50 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 20 25 30
 Ser Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 55 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Glu Ser Asp Glu Ala Tyr Pro Ala Val
 80 85 90
 65 Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95

<210> 37

<211> 94

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

10

<400> 37

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Ser Thr Ala Ile

1 5 10 15

15 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

20 25 30

Trp Ile Thr Pro Tyr Asp Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val

35 40 45

20

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala

50 55 60

Tyr Leu Leu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

65 70 75

25

Tyr Cys Ala Arg Thr Trp Phe Thr Leu Ala Ser Ala Met Glu Leu

80 85 90

30 Leu Gly Ser Ala

<210> 38

<211> 101

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

40

<400> 38

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Gly Asn Gly Ile

1 5 10 15

45 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

20 25 30

Trp Ile Ser Pro Thr Asn Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

35 40 45

50

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala

50 55 60

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

65 70 75

55

Tyr Cys Ala Arg Arg Val Asp Tyr Gln Val Tyr His Asp Arg Phe

80 85 90

60 Glu Glu Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

95 100

<210> 39

<211> 94

65 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

5

<400> 39

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn Ser Tyr Trp Ile
1 5 10 15

10 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
20 25 30

Trp Ile Ser Pro Asp Asn Gly Ala Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
35 40 45

15

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
50 55 60

20 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
65 70 75

Tyr Cys Ala Arg Lys Phe Trp Gly Trp Asp Trp Gly Gly Met Asp
80 85 90

25 Tyr Trp Gly Gln

<210> 40

<211> 94

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

35

<400> 40

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Ser Tyr Ile
1 5 10 15

40 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
20 25 30

Asp Ile Thr Pro Thr Asp Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
35 40 45

45

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
50 55 60

50 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
65 70 75

Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Met Trp Trp Asp Ser Ser Ala Met Asp
80 85 90

55 Tyr Trp Gly Gln

<210> 41

<211> 94

60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

65

<400> 41
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Ser Gly Ile
 1 5 10 15

5 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 20 25 30

Phe Ile Tyr Pro Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45

10 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 15 65 70 75

Tyr Cys Ala Arg Met Ser Leu Ile Gly Phe Ser Tyr Ala Met Asp
 80 85 90

20 Tyr Trp Gly Gln

<210> 42
 <211> 93
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polipéptidos sintéticos

30 <400> 42
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn Ser Thr Trp Ile
 1 5 10 15

35 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 20 25 30

Trp Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45

40 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 45 65 70 75

Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Tyr Asp Tyr Asp Ile Gly Phe Asp Tyr
 80 85 90

50 Trp Gly Gln

<210> 43
 <211> 288
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polinucleótidos sintéticos

60 <400> 43
 ttgtcctgtg cagctctgg cttcaccatt agtgattccg ctatacactg 50

ggcgctcag gccccgggta agggcctgga atgggttgct gggattactc 100

65

cttatagcgg ttatactgac tatgccgata gcgtcaaggg cggtttact 150
 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 5 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgcaaaagag gcccgcgagg 250
 gctacgacgt cggctacgt atggactact ggggtcaa 288
 <210> 44
 10 <211> 279
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> polinucleótidos sintéticos
 <400> 44
 ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtgattcct atatactg 50
 20 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttgct gaaatttctc 100
 ctctggcgg cgatacttac tatgccgata gcgtcaaggg cggtttact 150
 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 25 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtctc ttgtgggtgt 250
 gggacggggc tatggactac tgggtcaa 279
 30 <210> 45
 <211> 273
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> polinucleótidos sintéticos
 <400> 45
 ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actaatactt ggatactg 50
 40 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttgct gttattactc 100
 cttatggcgg tgctacttac tatgccgata gcgtcaaggg cggtttact 150
 45 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgcaagagag agtatgtgga 250
 gtaagttcga ctactgggtt caa 273
 50 <210> 46
 <211> 288
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> polinucleótidos sintéticos
 <400> 46
 60 ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt aatagttctg ctatactg 50
 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttggt tatattactc 100
 ctgataacgg tgatactaac tatgccgata gcgtcaaggg cggtttact 150
 65

ataagcgag acacatcaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aatagctgag gatactgccg tctattattg tgctcgccgc caggcaact 250

5 tctacggtac ctggcgccgt atggactact ggggtcaa 288

<210> 47
<211> 276
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> polinucleótidos sintéticos

15 <400> 47
ttgtctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtgggtctg atatacactg 50

ggtagctcag gccccgggta agggcctgga atgggttgc tatattaatc 100

20 cttatggcgg ttctactgac tatgccgata gcgtaaggg cggtttact 150

ataagcgag acacatcaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgccgc tacgagatgt 250

25 ggtacgttat ggactactgg ggtcaa 276

<210> 48
<211> 303
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polinucleótidos sintéticos

35 <400> 48
ttgtctgtg cagcttctgg cttcaccatt actaattcct ggatacactg 50

ggtagctcag gccccgggta agggcctgga atgggttgg gttattactc 100

40 cttctagcgg ttctactac tatgccgata gcgtaaggg cggtttact 150

ataagcgag acacatcaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

45 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgccgc gtctccccg 250

acatcgggga ctgcagcaac gcctactgct acgctatgga ctactgggg 300

caa 303

50 <210> 49
<211> 282
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> polinucleótidos sintéticos

<400> 49
60 ttgtctgtg cagcttctgg cttcaccatt actagtactt atatacactg 50

ggtagctcag gccccgggta agggcctgga atgggttgc tggatttctc 100

cttatagcgg ttactgac tatgccgata gcgtaaggg cggtttact 150

65

ataagcgag acacatcaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtgag gtgggggtggg 250
5 gggactcgtg cgctatggac tactggggtc aa 282
<210> 50
<211> 297
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> polinucleótidos sintéticos
15 <400> 50
ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtgggtctt ggatacactg 50
ggcgctcag gccccgggta agggcctgga atgggttgct gggattatc 100
20 cttatgacgg ttatacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgag acacatcaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtgag gccgagggcc 250
25 tgtaccagtc cgggatctac gacgcgggta tggactactg ggggtcaa 297
<210> 51
<211> 279
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> polinucleótidos sintéticos
35 <400> 51
ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actagtact atatacactg 50
ggcgctcag gccccgggta agggcctgga atgggttgct tggattatc 100
40 ctgctgacgg tgctacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgag acacatcaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
45 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtggg tctactctg 250
ggggctacga tatggactac tgggggtcaa 279
<210> 52
50 <211> 276
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
55 <223> polinucleótidos sintéticos
<400> 52
ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt aatgattctg atatacactg 50
60 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttggt attattatc 100
cttatgacgg ttatacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgag acacatcaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
65

aagagctgag gacactgccg tctattattg tgcaagaagc aacctggaca 250

acaactgtt cgactactgg ggtcaa 276

5 <210> 53
<211> 294
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> polinucleótidos sintéticos

<400> 53
ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt aatgggtact ggatacactg 50

15 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttgc gatattaatc 100

ctaattggcg tctactaac tatgccgata gcgtcaaggg cgtttcact 150

20 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtgcc taccggtgcg 250

gctggctcgc cgactgggcc ggggctatgg actactgggg tcaa 294

25 <210> 54
<211> 294
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> polinucleótidos sintéticos

<400> 54
ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtgggtctt ggatacactg 50

35 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttgc attattactc 100

cttctggcgg taatactgac tatgccgata gcgtcaaggg cgtttcact 150

40 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtgag gtcttcgccg 250

45 tgtcgaccgc cggctacccc tgggttatgg actactgggg tcaa 294

<210> 55
<211> 288
<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> polinucleótidos sintéticos

55 <400> 55
ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actgattctt ggatacactg 50

ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttgg tctattactc 100

60 ctataacgg taatactgac tatgccgata gcgtcaaggg cgtttcact 150

ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctgcagg ggggagtcgg 250

65

acgaggccta cgccgcggtt atggactact ggggtcaa 288

<210> 56
<211> 291
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> polinucleótidos sintéticos

10 <400> 56
ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtagttccg atatacactg 50

15 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttgg actattaatc 100
ctgctagcgg ttctactgac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

20 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgggc gccaacagca 250
gcttctacgc gctccagtac gttatggact actgggtca a 291

<210> 57
25 <211> 294
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> polinucleótidos sintéticos

<400> 57
ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actgataatt atatacactg 50

35 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttgg tggatttctc 100
cttatagcgg ttatacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

40 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtgag accctcttct 250
acgacaagga ccagtactcc tacgttatgg actactgggg tcaa 294

45 <210> 58
<211> 282
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> polinucleótidos sintéticos

<400> 58
ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtagttctt atatacactg 50

55 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttgg tggatttctc 100
cttatagcgg ttatactgac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150

60 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtgag gggctcctgc 250
ggtggggcta cgctatggac tactggggtc aa 282

65

<210> 59
 <211> 291
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> polinucleótidos sintéticos
 <400> 59
 10 ttgtctgtg cagcttctgg cttcaccatt actgataatg ggataactg 50
 ggtgctgcag gccccgggta agggcctgga atgggttgg tggattactc 100
 ctactagcgg ttatactaac tatgccgata gcgtcaaggg cgttttact 150
 15 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgcgac ggggacacct 250
 20 ggaagtggga cgccccgtac gttatggact actgggggtca a 291
 <210> 60
 <211> 291
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> polinucleótidos sintéticos
 <400> 60
 30 ttgtctgtg cagcttctgg cttcaccatt actaatactt atataactg 50
 ggtgctgcag gccccgggta agggcctgga atgggttgg tggatttctc 100
 35 cttatagcgg ttatactgac tatgccgata gcgtcaagga cgttttact 150
 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgcgag atcttgctgg 250
 40 actacggttc cgccgggtac gctatggact actgggggtca a 291
 <210> 61
 <211> 291
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> polinucleótidos sintéticos
 50 <400> 61
 ttgtctgtg cagcttctgg cttcaccatt actagtaact ggataactg 50
 ggtgctgcag gccccgggta agggcctgga atgggttgg gttattactc 100
 55 ctactaacgg ttactactac tatgccgata gcgtcaaggg cgttttact 150
 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgcgag gtgtggtgg 250
 60 ggggcgacgg ccacgggtac gttatggact actgggggtca a 291
 <210> 62
 65 <211> 288

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> polinucleótidos sintéticos

 <400> 62
 ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtagttctg ctatacactg 50
 10 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttggg gggattactc 100
 ctgctagcgg ttatacttac tatgccgata gcgtaaggg ccgtttcact 150
 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 15 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgctcg cccggcgggg 250
 tgctcgtcga cggcgggggt atggactact ggggtcaa 288
 20 <210> 63
 <211> 303
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> polinucleótidos sintéticos

 <400> 63
 30 ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt aatagtactg atatacactg 50
 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttggg aggattaatc 100
 cttctggcgg ttactaatac tatgccgata gcgtaaggg ccgtttcact 150
 35 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtaac agcgcgtaca 250
 ccacgtgggc ggtcgactgg ttcatggct acgttatgga ctactggggg 300
 40 caa 303

 <210> 64
 <211> 303
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> polinucleótidos sintéticos
 50 <400> 64
 ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actggttacg ggatacactg 50
 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttggg tggatttctc 100
 55 cttctaacgg ttatacttac tatgccgata gcgtaaggg ccgtttcact 150
 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 60 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtcgc gtcagctact 250
 acgtctacag gcacgactgg gtcaggggct acgttatgga ctactggggg 300
 caa 303
 65

<210> 65
 <211> 267
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> polinucleótidos sintéticos
 <400> 65
 10 ttgtctgtg cagcttctgg cttcaccatt actgatacct ggatacactg 50
 ggtgctgcag gccccgggta agggcctgga atgggttgg gttattactc 100
 cttatggcgg ttatacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
 15 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgcaagagac gggggcttct 250
 20 tcgattactg gggtaa 267
 <210> 66
 <211> 282
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> polinucleótidos sintéticos
 <400> 66
 30 ttgtctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtgattcct ctatacactg 50
 ggtgctgcag gccccgggta agggcctgga atgggttgc tttattatc 100
 35 ctactagcgg ttacttac tatgccaata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgcacgtgcc tcgtacgggg 250
 40 tgagcaagtg gaccttgac tactggggtc aa 282
 <210> 67
 <211> 303
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> polinucleótidos sintéticos
 50 <400> 67
 ttgtctgtg cagcttctgg cttcaccatt actggttac ggatacactg 50
 ggtgctgcag gccccgggta agggcctgga atgggttgc tggatttctc 100
 55 cttctaagg ttatacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 60 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtgc gtcagctact 250
 acgtctacag gcacgactgg gtcaggggct acgttatgga ctactgggg 300
 caa 303
 65

<210> 68
 <211> 288
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> polinucleótidos sintéticos
 <400> 68
 10 ttgtctgtg cagcttctgg cttcaccatt actggtactt atatacactg 50
 ggtgctgcag gccccgggta agggcctgga atgggtgct tggattctc 100
 cttatagcgg ttatactaac tatgccgata gcgtcaaggc cggtttact 150
 15 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgcaagagag gcccgctcct 250
 20 cgttgagcgc ggactacgt atggactact ggggtcaa 288
 <210> 69
 <211> 294
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> polinucleótidos sintéticos
 <400> 69
 30 ttgtctgtg cagcttctgg cttcaccatt actgataatt atatacactg 50
 ggtgctgcag gccccgggta agggcctgga atgggtgct tggattctc 100
 35 cttatagcgg ttatactac tatgccgata gcgtcaaggc cggtttact 150
 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtgag tccggcttct 250
 40 ccgcgtgcaa caccggggcg tacgctatgg actactgggg tcaa 294
 <210> 70
 <211> 288
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> polinucleótidos sintéticos
 50 <400> 70
 ttgtctgtg cagcttctgg cttcaccatt actgattctt ggatacactg 50
 ggtgctgcag gccccgggta agggcctgga atgggtggt tctattactc 100
 55 cttataacgg taatactgac tatgccgata gcgtcaaggc cggtttact 150
 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 60 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgcagg ggggagtcg 250
 acgaggccta ccccgcggtt atggactact ggggtcaa 288
 <210> 71
 65 <211> 280

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> polinucleótidos sintéticos

<400> 71
 ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actagtaccg ctatacactg 50

10 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttgct tggattactc 100
 cttatgacgg ttatactgac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctactaa tgaacagctt 200

15 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtagc tggttcacgc 250
 tggcctcggc tatggaacta ctggggtaaa 280

20 <210> 72
 <211> 303
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> polinucleótidos sintéticos

<400> 72
 30 ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actggaatg ggatacactg 50
 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttgct tggatttctc 100
 ctactaacgg ttctacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150

35 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtagg gtcgactacc 250
 aggtctacca cgaccgctc gaggaggggt acgctatgga ctactgggggt 300

40 caa 303

<210> 73
 <211> 282
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> polinucleótidos sintéticos

50 <400> 73
 ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt aatagttatt ggatacactg 50
 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttggt tggatttctc 100

55 ctgataacgg tgctactaac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
 ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

60 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtaag ttctgggggt 250
 gggactgggg gggatggac tactggggtc aa 282

<210> 74
 65 <211> 282

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> polinucleótidos sintéticos

 <400> 74
 ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtgattctt atatacactg 50
 10 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttggt gatattactc 100
 ctactgacgg ttactgac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
 ataagcgcag acacatcaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 15 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtaac ttgatgtggt 250
 gggactcgtc ggctatggac tactggggtc aa 282
 20 <210> 75
 <211> 282
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> polinucleótidos sintéticos

 <400> 75
 ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtgattctg ggatacactg 50
 30 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttggt ttattttatc 100
 ctaatggcgg ttacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
 35 ataagcgcag acacatcaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgatg tcgttgatcg 250
 ggttctgta cgctatggac tactggggtc aa 282
 40 <210> 76
 <211> 279
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> polinucleótidos sintéticos

 <400> 76
 50 ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt aatagtagct ggatacactg 50
 ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttgct tggattaatc 100
 ctataacgg ttacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
 55 ataagcgcag acacatcaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
 aagagctgag gacactgccg tctattattg tgcaagagac ttgtacgact 250
 60 acgacatcgg cttcgactac tgggggtcaa 279

 <210> 77
 <211> 133
 <212> PRT
 65 <213> Homo sapiens

<400> 77
 Arg Lys Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu
 1 5 10 15
 5 Ser Cys Pro Pro Val Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Asp Ile Gly
 20 25 30
 10 Ile Ile Asn Glu Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu
 35 40 45
 Ser Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro
 50 55 60
 15 Asn Arg Tyr Pro Ser Glu Val Val Gln Ala Gln Cys Arg Asn Leu
 65 70 75
 Gly Cys Ile Asn Ala Gln Gly Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser
 80 85 90
 20 Val Pro Ile Gln Gln Glu Thr Leu Val Val Arg Arg Lys His Gln
 95 100 105
 Gly Cys Ser Val Ser Phe Gln Leu Glu Lys Val Leu Val Thr Val
 110 115 120
 25 Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Val Ile His His Val Gln
 125 130
 30 <210> 78
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 78
 Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp
 1 5 10 15
 40 Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn
 20 25 30
 Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn
 35 40 45
 45 Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu
 50 55 60
 Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly
 65 70 75
 50 Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val
 80 85 90
 Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His
 95 100 105
 55 Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly
 110 115 120
 60 Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
 125 130
 <210> 79
 <211> 10
 65 <212> PRT

ES 2 751 414 T5

<213> Homo sapiens

<400> 79

Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg

5 1 5 10

<210> 80

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

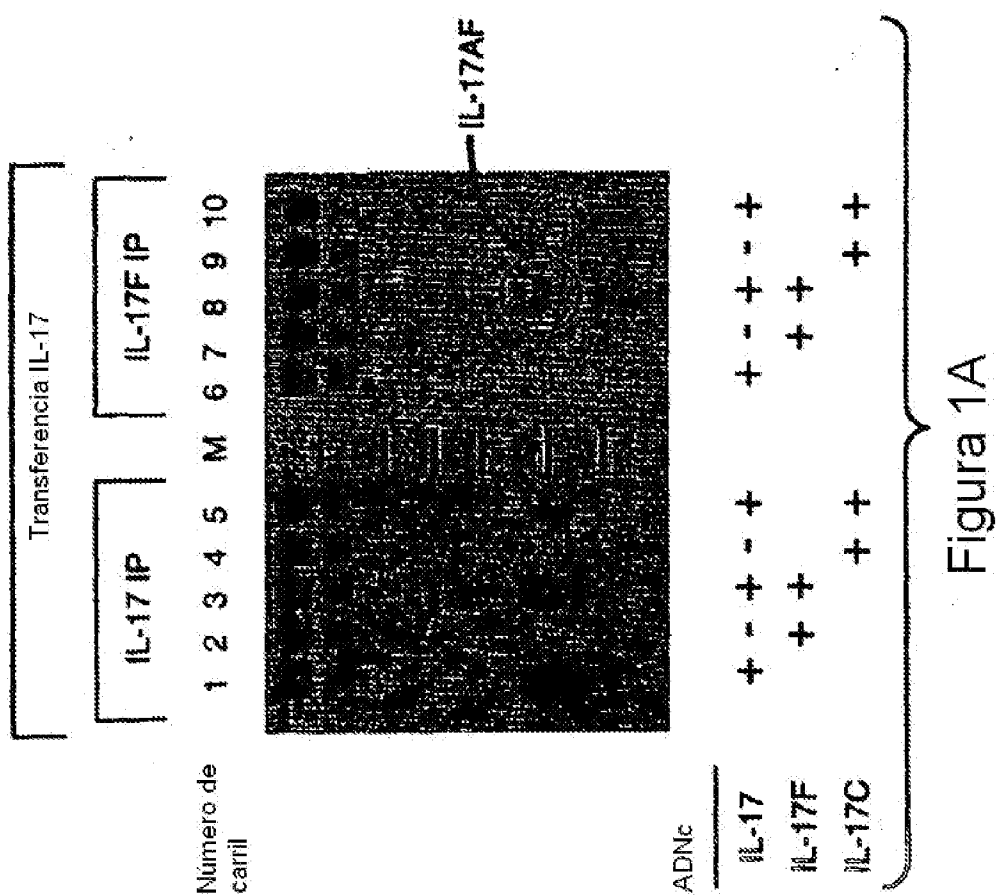
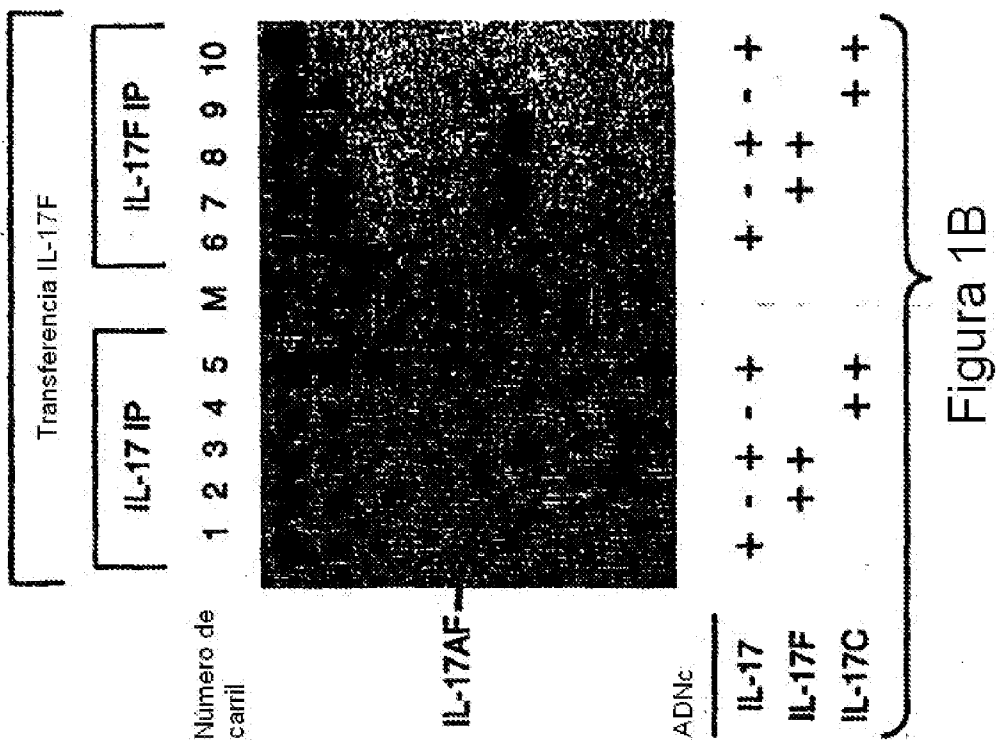
<400> 80

Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys

1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Antagonista de un polipéptido IL-17A/F, en el que el antagonista es un anticuerpo anti-IL-17A/F, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o humano, y en el que el polipéptido IL-17A/F es:
5 un polipéptido aislado que comprende:
(a) la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IL-17A/F que comprende la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4; o
(b) la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IL-17A/F que comprende la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 que carecen de sus péptidos señal asociados.
- 10 2. Anticuerpo anti-IL-17A/F antagonista, según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido IL-17 A/F comprende un complejo heterodimérico que comprende la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 que carecen de sus péptidos señal asociados.
- 15 3. Anticuerpo anti-IL-17A/F antagonista, según la reivindicación 2, en el que dicho complejo heterodimérico comprende dos enlaces disulfuro intercatenarios entre la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 o entre la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4 que carecen de sus péptidos señal asociados.
- 20 4. Anticuerpo anti-IL-17A/F antagonista, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido aislado que comprende la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, que carecen de sus péptidos señal asociados.
- 25 5. Anticuerpo anti-IL-17A/F antagonista, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polipéptido aislado es un polipéptido heterodimérico de IL-17A/F maduro que consiste en:
(i) una cadena de IL-17A que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 que carece de su péptido señal; y
(ii) una cadena de IL-17F que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 que carece de su péptido señal,
y que tiene puentes disulfuro:
(a) entre el residuo 47 de la cadena de IL-17F y el residuo 129 de la cadena de IL-17A;
(b) entre el residuo 137 de la cadena IL-17F y el residuo 33 de la cadena de IL-17A;
30 (c) entre los residuos 102 y 152 de la cadena de IL-17F;
(d) entre los residuos 107 y 154 de la cadena de IL-17F;
(e) entre los residuos 94 y 144 de la cadena de IL-17A; y
(f) entre los residuos 99 y 146 de la cadena de IL-17A;
en el que la numeración de los residuos es desde el residuo metionina de iniciación de cada cadena.
35



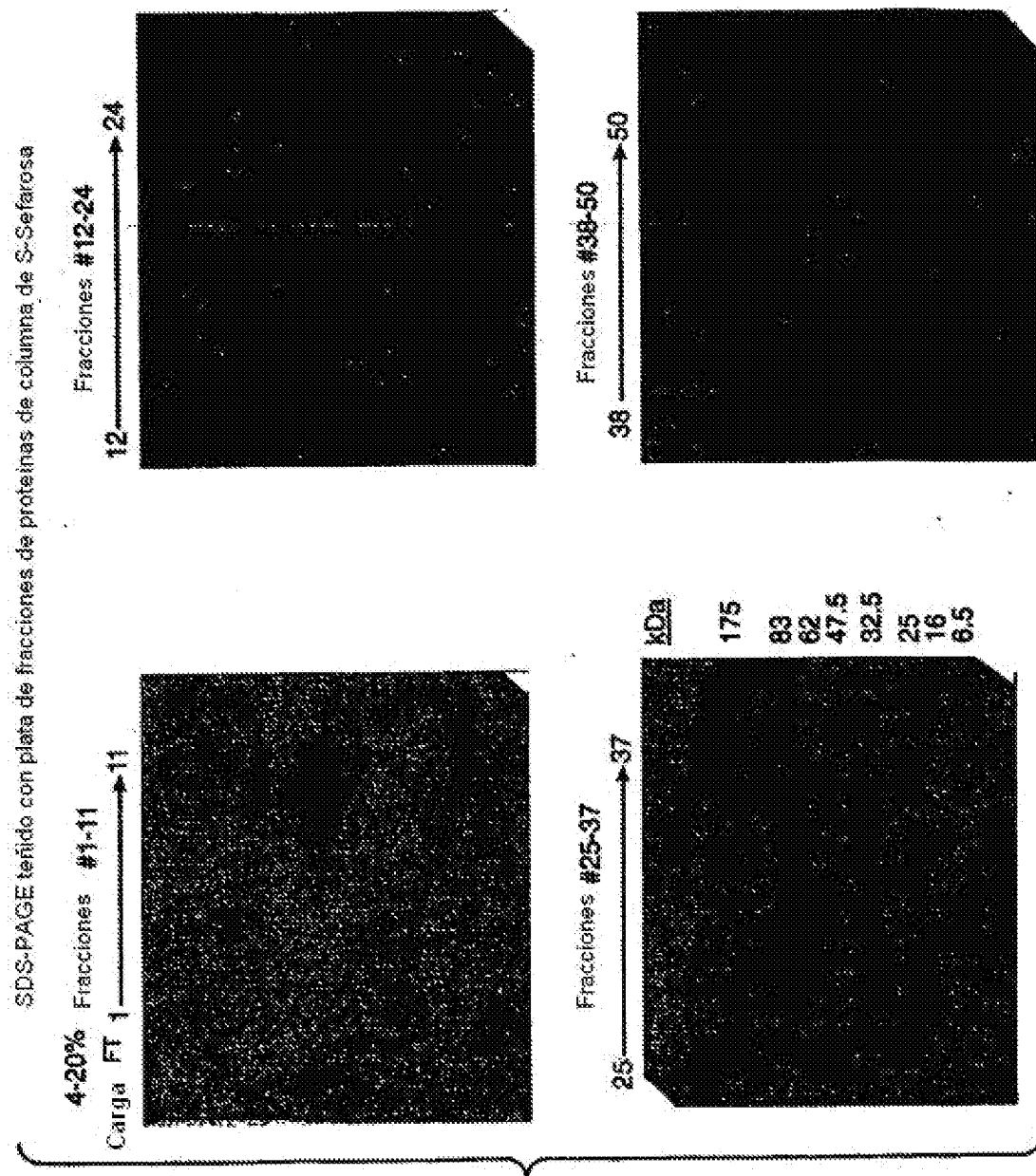
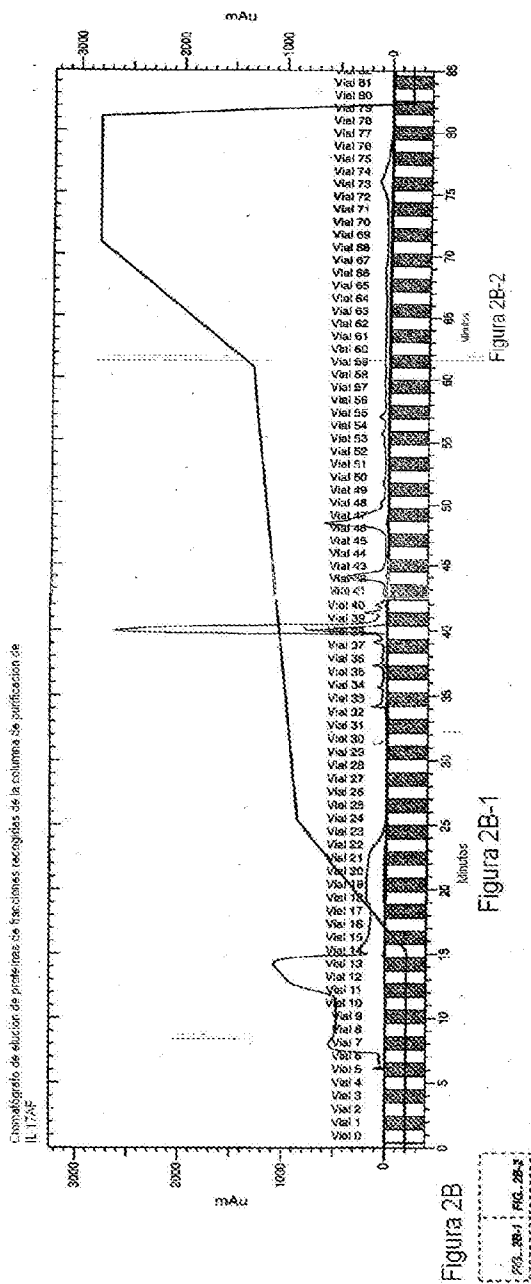


Figura 2A



Actividad de inducción de IL-8 por las fracciones de la columna de purificación de IL-17AF

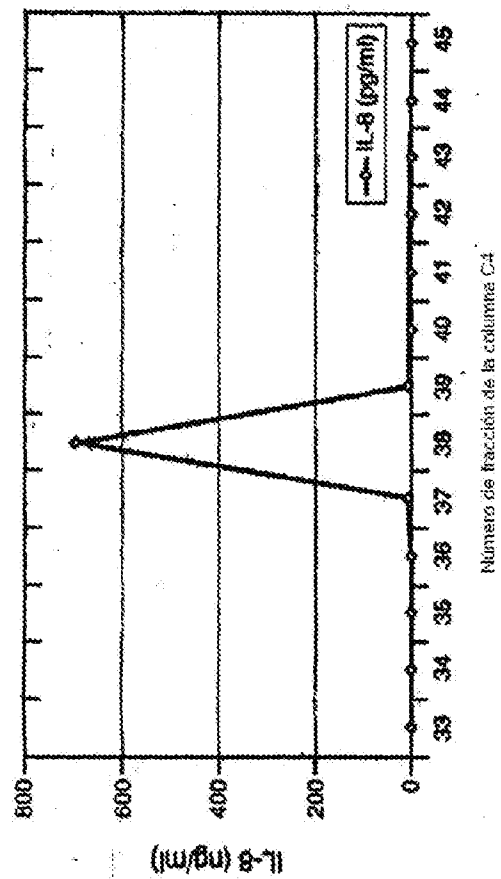


Figura 2C

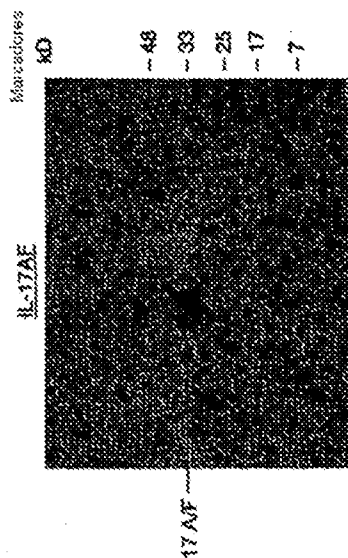


Figura 3A

Resultados de datos de las secuencias												
SEQ ID NO:	1/3	2/4	3/5	4/6	5/7	6/8	7/9	8/10	9/11	10/12	11/13	12/14
	ciclizantes											
SEQ ID NO:1	G	I	T	I	P	R	N	P	G	C	P	N
	11.353	16.037	6.719	16.620	10.757	3.563	4.106	8.523	4.488	0.076	7.599	3.502
SEQ ID NO:2	R	K	I	P	K	V	G	H	T	F	(F)	Q
	16.196	3.837	25.196	6.655	2.679	7.060	2.395	3.082	2.395	3.263	7.163	4.522

8-11-61

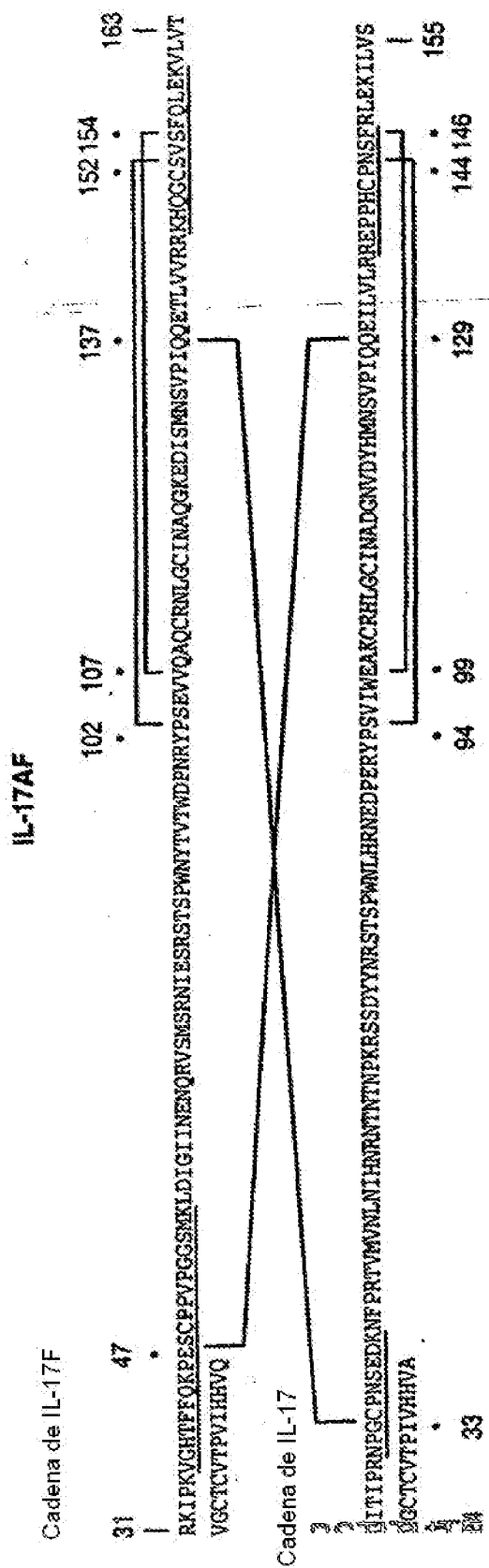
23-37

INTCKTS1VSL1LLLSL5AIVKAGSTTPRNFPCPNSEKDFPRTVAVNLINHRMTNTA
PSESDYNNRSTSPNLFHNEDEPERFSTWEAKCNHLCINADENVYHNSVP1QOE1
LUTAREPHCPNSTRLEKILUSVGC7CVTVIHVVA (SEQ ID NO 3)

323-

MTVTLLHCHAMKILLISILGLXLEBAAKIPKVGHTFFQKPCSCPVPQGGMKL
DIDHINERHVSMSRNLESRSFTSPRYITVTWDFRYPFSEVQACRMGCINAGQEDISM
NSVPIQSTLVRHNRGCGSUSFQLEKLVTCGCTCTVTVIHVQ (SEQ ID NO.4)

Figure 3C



IL-17AF contiene dos enlaces disulfuro entre cadenas:

residuo de cisteína 47 de la cadena de IL-17F y el residuo de cisteína 129 de la cadena de IL-17

residuo de cisteína 137 de la cadena de IL-17F y el residuo de cisteína 33 de la cadena IL-17

Figura 4A

Fragmento de 1 de enlace disulfuro de IL-17AF

VGHTFFQKPESCPPVPGGSMK (aminoácidos 36-56 del péptido digerido con tripsina de la cadena IL-17F)

↓
EPPHCPNSFR

(aminoácidos 125-134 del péptido digerido con tripsina de la cadena IL-17F)

$[M+H]^+ = 3410.58 \text{ Da}$

monoisotópico

Fragmento 2 de enlace disulfuro de IL-17AF

HQCCSVSFQLEK (aminoácidos 134-145 del péptido digerido con tripsina de la cadena IL-17F)

↓
NPGCPNSEDK

(aminoácidos 30-39 del péptido digerido con tripsina de la cadena IL-17)

$[M+H]^+ = 2420.05 \text{ Da}$

monoisotópico

Figura 4B

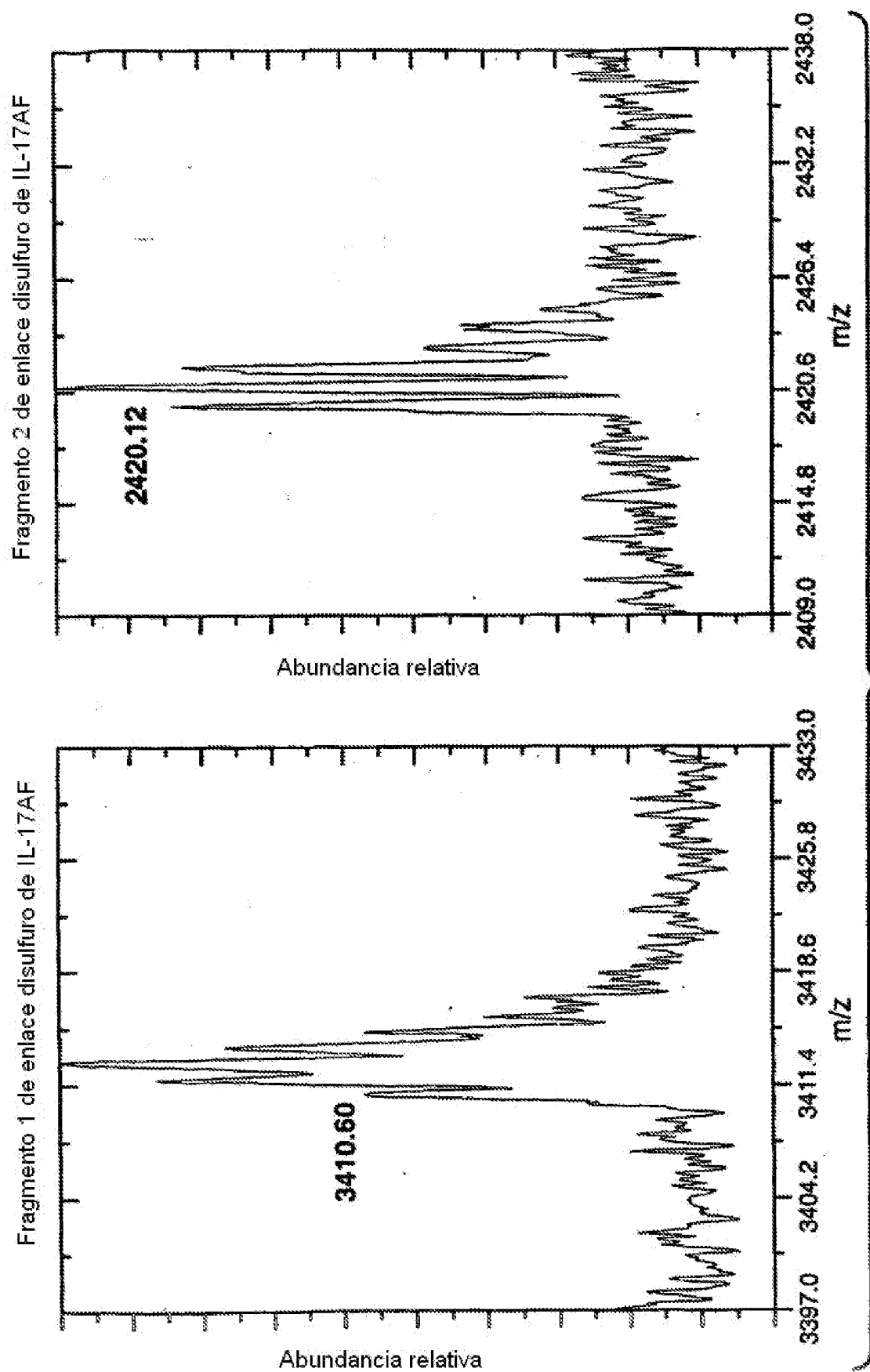


Figura 4C



Respuesta de la dosis de la actividad de IL-17AF en la inducción de IL-8:
Potencia distinta comparada con IL-17 e IL-17F

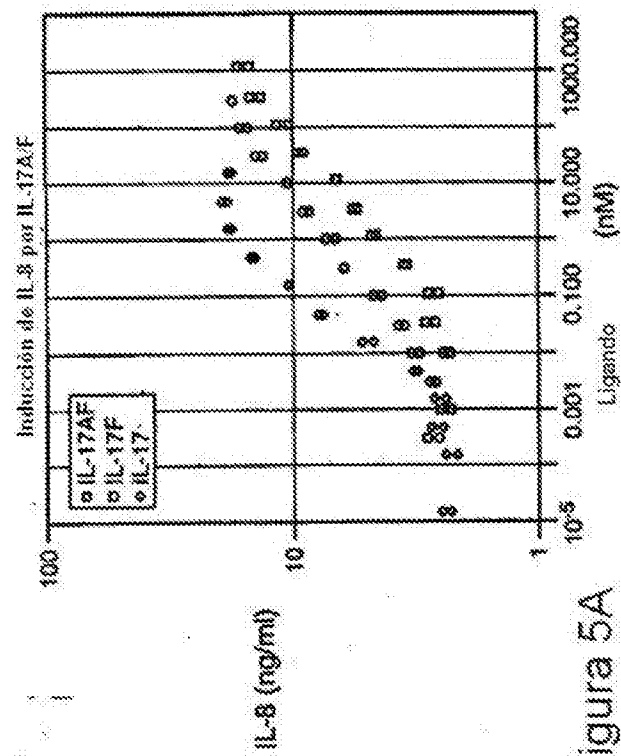


Figura 5A

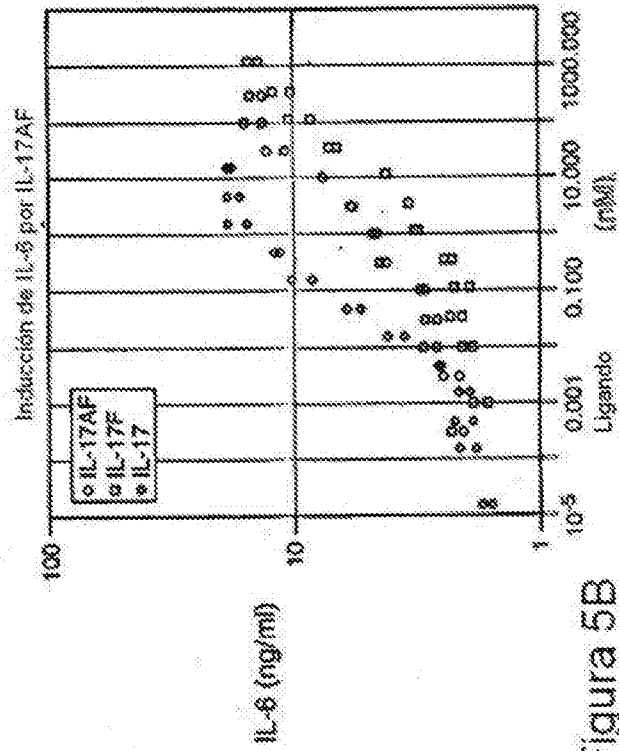


Figura 5B

Secuencia de aminoácidos de la región de la región variable de cadena pesada que contiene CDR-H1-H3 de Fab que se une a IL-17AF

Clon #	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
1	LSCAASGFTTISDSAIHWRQAPGKGLEWVAGITPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCAKAREGTDVGYANDYWGQ		
2	LSCAASGFTTISDSYIHWVRQAPGKGLEWVAEIPFGCDTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARLLAWDGAANDYWGQ		
3	LSCAASGFTTITWTIHWVRQAPGKGLEWVAITPFGGATYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARSHWSKFDYWGQ		
4	LSCAASGFTTINSIAIHWVRQAPGKGLEWVGIPTDNGTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARHGHPYCTMAANDYWGQ		
5	LSCAASGFTTISGSDIHWVRQAPGKGLEWVAITPFGGSTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARAYEKWYVMDYWGQ		
6	LSCAASGFTTITNSIHWVRQAPGKGLEWVGITPSSGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVFPFDIGDCSNAYCYANDYWGQ		
7	LSCAASGFTTITSTYIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVGVGDSYANDYWGQ		
8	LSCAASGFTTISGSWIHWVRQAPGKGLEWVAGIYPTDGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARAEGLYQSGIYDACHDYWGQ		
9	LSCAASGFTTITSYIHWVRQAPGKGLEWVAWIPADGATYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARSGYFGGYDMDYWGQ		
10	LSCAASGFTTINDSDIHWVRQAPGKGLEWVGIIYPIYDGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARSLNLDNMLFDYWGQ		
11	LSCAASGFTTINGYIHWVRQAPGKGLEWVADINPGGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARXRCGLADWAGANDYWGQ		
12	LSCAASGFTTISGSWIHWVRQAPGKGLEWVAIITPSSGNTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVFAVSTAGYFWMDYWGQ		
13	LSCAASGFTTITDSDIHWVRQAPGKGLEWVGSIPTPNTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARHGESEDEAYAVMDYWGQ		
14	LSCAASGFTTISSDIHWVRQAPGKGLEWVGITINPAGSTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARGANSFYALQYVMDYWGQ		
15	LSCAASGFTTITDNYIHWVRQAPGKGLEWVGWISPYSGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARETILFYDKDQSYVMDYWGQ		
16	LSCAASGFTTISHSYIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARGLRWSTANDYWGQ		
17	LSCAASGFTTITDNGIHWVRQAPGKGLEWVGWITPISGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARDGTWKNVDAFYVMDYWGQ		
18	LSCAASGFTTITNTYIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARREILLDYGSAGYANDYWGQ		
19	LSCAASGFTTITSTYIHWVRQAPGKGLEWVGITPNTGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVWNGDGHGYVMDYWGQ		
20	LSCAASGFTTISSAIHWVRQAPGKGLEWVGITPASPAGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARSPGGYFVDSGVMDYWGQ		
21	LSCAASGFTTINSTDYIHWVRQAPGKGLEWVGWISPYSGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVYVYVREDWVRGYVMDYWGQ		
22	LSCAASGFTTITGYIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVYVYVREDWVRGYVMDYWGQ		
23	LSCAASGFTTITDWTIHWVRQAPGKGLEWVGWITPISGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVYVYVREDWVRGYVMDYWGQ		
24	LSCAASGFTTISDSIHWVRQAPGKGLEWVAITPISGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVYVYVREDWVRGYVMDYWGQ		
25	LSCAASGFTTITGYIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVYVYVREDWVRGYVMDYWGQ		
26	LSCAASGFTTITGYIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVYVYVREDWVRGYVMDYWGQ		
27	LSCAASGFTTITDNYIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVYVYVREDWVRGYVMDYWGQ		
28	LSCAASGFTTITDSDIHWVRQAPGKGLEWVGWISPYSGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVYVYVREDWVRGYVMDYWGQ		
29	LSCAASGFTTITSTAIHWVRQAPGKGLEWVAWITPISGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVYVYVREDWVRGYVMDYWGQ		
30	LSCAASGFTTITNGIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYSGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVYVYVREDWVRGYVMDYWGQ		
31	LSCAASGFTTINSYIHWVRQAPGKGLEWVGWISPYSGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVYVYVREDWVRGYVMDYWGQ		
32	LSCAASGFTTISDSYIHWVRQAPGKGLEWVGWITPISGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVYVYVREDWVRGYVMDYWGQ		
33	LSCAASGFTTISDSGIHWVRQAPGKGLEWVGWITPISGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVYVYVREDWVRGYVMDYWGQ		
34	LSCAASGFTTINSTIHWVRQAPGKGLEWVAWITPISGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMSLRAEDTAVVYCARVYVYVREDWVRGYVMDYWGQ		

Figura 6

GCAGGCACAACTCATCCATCCCCAGTTGATTGGAAGAAACAACCGATGACTCCTGGGAAG
 ACCTCATTTGGTGTCACTGCTACTGCTGCTGAGCCTGGAGGCCATAGTGAAGGCAGGAATC
 ACAATCCCACGAAATCCAGGATGCCCAAATCTGAGGACAAGAACTTCCCCCGGACTGTG
 ATGGTCAACCTGAACATCCATAACCGGAATACCAATACCAATCCCAAAGGTCTCTCAGAT
 TACTACAACCGATCCACCTCACCTTGGGAATCTCCACCGCAATGAGGACCCTGAGAGATAT
 CCTCTGTGATCTGGGAGGCAAAGTGCCGCCACTTGGGCTGCATCAACGCTGATGGGAAC
 GTGGACTACCACATGAACTCTGTCCCCATCCAGCAAGAGATCCTGGTCTGCGCAGGGAG
 CCTCCACACTGCCCCAACTCCTTCCGGCTGGAGAAGATACTGGTGTCCGTGGGCTGCACC
 TGTGTCAACCCCGATTGTCCACCATGTGGCCTAAGAGCTCTGGGGAGCCCACTCCCCAA
 AGCAGTTAGACTATGGAGAGCCGACCCAGCCCCCTCAGGAACCCCTCATCCTTCAAAGACAG
 CCTCATTTTCGGACTAAACTCATTAGAGTTCTTAAGGCAGTTTGTCCAATTAAAGCTTCAG
 AGGTAACACTTGGCCAAGATATGAGATCTGAATTACCTTTCCCTCTTTCCAAGAAGGAAG
 GTTTGACTGAGTACCAATTTGCTTCTTGTTTACTTTTAAAGGGCTTTAAGTTATTTATG
 TATTTAATATGCCCTGAGATAACTTTGGGGTATAAGATTCCATTTTAATGAATTACCTAC
 TTTATTTTGTGTCTTTTAAAGAAGATAAGATTCTGGGCTTGGGAATTTTATTATTTA
 AAAGGTAAAACCTGTATTTATTTGAGCTATTTAAGGATCTATTTATGTTTAAAGTATTTAG
 AAAAAGGTGAAAAGCACTATTATCAGTTCTGCCTAGGTAAATGTAAGATAGAATTAAAT
 GGCAGTGCAAATTTCTGAGTCTTTACAACATACGGATATAGTATTTCTCCTCTTTGTT
 TTTAAAAGTTATAACATGGCTGAAAAGAAAGATTAAACCTACTTTCATATGTATTAATTT
 AAATTTTGCAATTTGTTGAGGTTTTACAAGAGATACAGCAAGTCTAACTCTCTGTTCCAT
 TAAACCCTTATAATAAAATCCTTCTGTAATAATAAGTTTCAAAGAAAATGTTTATTTG
 TTCTCATTAATGTATTTTAGCAAACCTCAGCTCTTCCCTATTGGGAAGAGTTATGCAAAT
 TCTCCTATAAGCAAAACAAAGCATGTCTTTGAGTAACAATGACCTGGAAATACCCAAAT
 TCCAAGTTCTCGATTTACATGCCTTCAAGACTGAACACCGACTAAGGTFTTCATACTAT
 TAGCCAATGCTGTAGACAGAAGCATTTTGATAGGAATAGAGCAAATAAGATAATGGCCCT
 GAGGAATGGCATGTCAATTATTAAGATCATATGGGGAAAATGAAACCCTCCCCAAAATAC
 AAGAAGTTCTGGGAGGAGACATTGTCTTCAGACTACAATGTCCAGTTTCTCCCCTAGACT
 CAGGCTTCCTTTGGAGATTAAGGCCCTCAGAGATCAACAGACCAACATTTTCTCTTCC
 TCAAGCAACACTCCTAGGGCCTGGCTTCTGTCTGATCAAGGCACCACACAACCCAGAAAG
 GAGCTGATGGGGCAGAACGAACTTTAAGTATGAGAAAAGTTCAGCCCAAGTAAAATAAAA
 ACTCAATCACATTCAATTCCAGAGTAGTTTCAAGTTTCACATCGTAACCATTTTCGCCC

Figura 7

MTPGKTSLVSLLLLLSLEAIVKAGITIPRNP GCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNP
KRSSDYYNRSTSPWNLHRNEDPERYP SVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEIL
VLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA

Figura 8

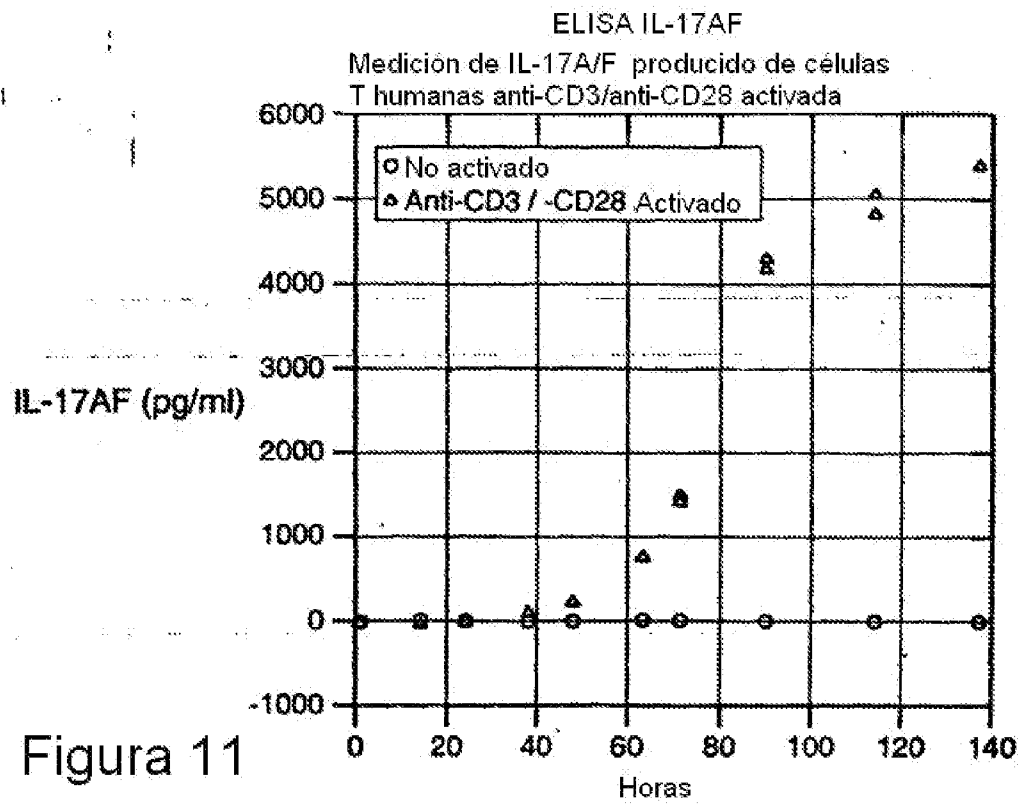
CAACTGCACCTCGGTTCTATCGATAGCCACCAGCGCAACATGACAGTGAAGACCCTGCAT
GGCCCAGCCATGGTCAAGTACTTGCTGCTGTCGATATTGGGGCTTGCCTTTCTGAGTGAG
GCGGCAGCTCGGAAAATCCCCAAAGTAGGACATACTTTTTTCCAAAAGCCTGAGAGTTGC
CCGCCTGTGCCAGGAGGTAGTATGAAGCTTGACATTGGCATCATCAATGAAAACCAGCGC
GTTTCCATGTCACGTAACATCGAGAGCCGCTCCACCTCCCCCTGGAATTACACTGTCACT
TGGGACCCCAACCGGTACCCCTCGGAAGTTGTACAGGCCAGTGTAGGAACCTGGGCTGC
ATCAATGCTCAAGGAAAGGAAGACATCTCCATGAATTCCGTTCCCATCCAGCAAGAGACC
CTGGTCGTCCGGAGGAAGCACCAAGGCTGCTCTGTTTCTTCCAGTTGGAGAAGGTGCTG
GTGACTGTTGGCTGCACCTGCGTCACCCCTGTCATCCACCATGTGCAGTAAGAGGTGCAT
ATCCACTCAGCTGAAGAAG

Figura 9

MTVKTLHGPA~~M~~VKYLLLSILGLAFLSEAAARKIPKVGHTFFQKPESCPPVPGGSMKLDIG
 IINENQ~~R~~VSM~~S~~RNI~~E~~SRSTSPWNYTVTWDPNRY~~P~~SEVVQAQCRNLGCINAQ~~G~~KEDISMNS
 VPIQ~~Q~~ETLVVRRKHQGC~~S~~VSFQLEKVLVTVGCTCVTPVIHHVQ

Secuencia señal:	Aminoácidos	1-30
Sitio de N-glicosilación:	Aminoácidos	83-86
Sitios de N-miristoilación:	Aminoácidos	106-111; 136-141

Figura 10



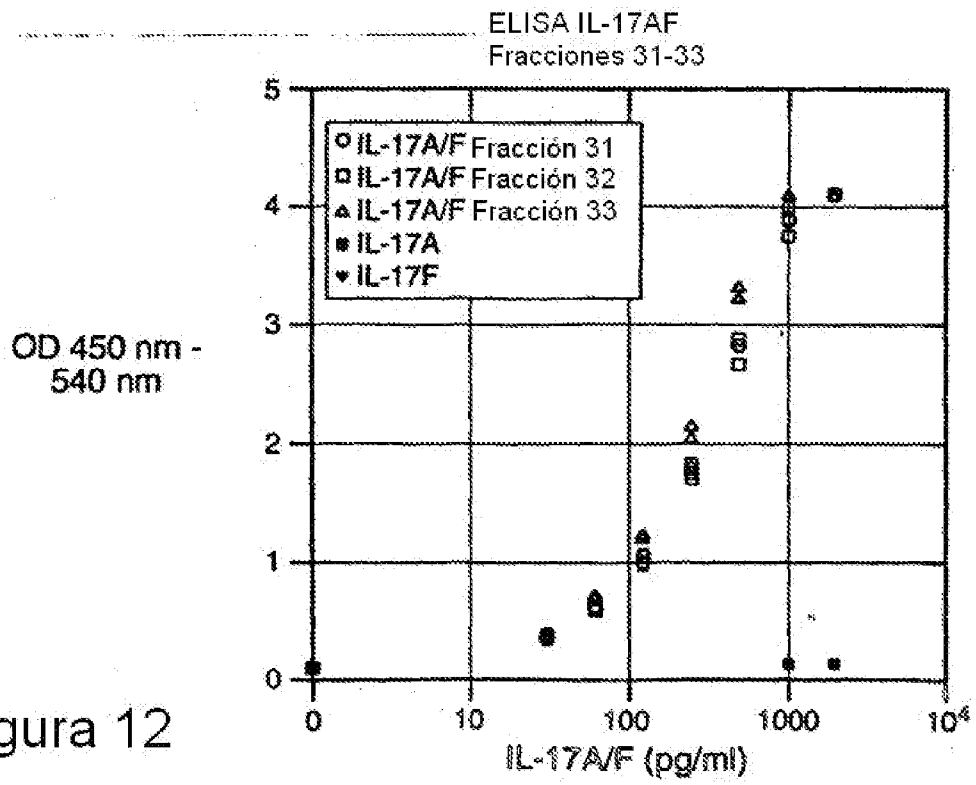


Figura 12