SUPERNflNDENCA DE INDUS1RIA Y COMRCO

1IIUIIIllllhIIUlII1IIILOIitIIIlll
No. 07.080717- -00003-0000 con Indus C mercio F-echa: 2008-09-05 15:57:20 Dep. 2020 NUECREACON[

TT1TTtflT kTC1TA Tra. 11 PA’IENILWII Eve: 378 FASENACIONALI
Act, 329 CTOINFORMACION Folios: 121 FORMULARIO UNICO DE

(Tj SOLICITUD DE

CorrocOn do Error Material Modificacion de LiflO solicitud

Nonibre: W’T I II

SOUCITANTE IDENTIFICACION
Direccion: c (rId.: 1: u \l. liiii d7940 1eid

cc, L1 NIT
Nacionalidad a DorTric-ilio: lcri\. -iih tiiidi

Lugar de Con,stituciorr: Dt;r]r’, suid CE Otro

- -

TetØfono: Fax: CLIOI
E-Mail N morn

Nombre: ALVARO CORREA ORDOEZ IDENTIFICACION

REPRESENTP/NTE Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6o. C.C. [] NIT fl
APODERA9Q C.E. LJ Otro

TelØfono: 634 1500 Fax: 3762211 Cual

E-Mail: patents.bogotafibakernet.corn NOmero 79.143.366 IP 20.281

Nurnoro do expedierite

07.I)0

50 Descripcióri do la corrección o modificación solicitada Wi iri Oc Li iliou:d JILL’:d cn
CIrL’LCIin d mr

cc:rcirui iiiiorihwv .;ri uccir:: ki,,cc1it:nci:1 p()u:r:LrcI0r]:ttW rrukruic IriuirricidiW
rc’ina
E0,r tL’hcrr utirrir
’ uicJiw: ervCvn. -

mosComprobante la tasa. Poderes, fure
existencia representciOn de personasjuridicas.

2009 L1 ’F

IVERINTMENCIA DE INDUSTRI Y NER(:IO

NIT

ECHA, A50140 29 OF 2002 --Nr y COMERCO

0FICIL

E N o .

07-0807i7- -00003-0000

1ADEINDUSTRA

2008.09.0515:57:2D Dep.2020NUEGREACIONE

3 Foros I 2

Act 29 RMACION
W :
CDN9 1 6 N A C I G??N H** --

SI1AN1E TIPuP4Nr0rENr - FLCH80 1 ---" -- I-

- ’

VER & MCKENZIE C0NSI6C BANCO DE 0OTA 02754387 4612216 2fO8/200e O

**m C 0 N C E P T 0 m*t

CPNT REP4TI5T!C9

-

CI)NCEPTO

- . -

TOTAL CONCEPTu

I 0fX5-01-03 CNBID DE Ifl IAD Y MOD WICA 12 MARC V LEHAS C0NERCIAES IO3,c,I
. I OTAL 1u3OIw O

CIENTO TRES NIL PESOS

/Jw

1SP0WSABLE

RECISO 0 CAJA

ell

- 1-

- 1-

TITULO

PARA INTERLEUCINA47F Y OTROS ANTAGONISTAS DE

LA SEfALIZACION DE I1 -17F, y SUS USOS

ANTECEDENTES DEL INVENTO

relacionadas

11 Esta solicitud tiene prioridad sobre la Solicitud de Patente Provisional de UU. N° 60/653.260, presentada el 14 de:febrero de 2005, y la Solicitud de Patente visional N° 60/667.492, presentada el 10 de abril de 2005, ambas incorporadas aqui su totalidad como referencia.

Campo del invento
100021 Este invento se relaciona con anticuerpos, por ejemplo anticuerpos intactos y sus fragmentos conjugados con antigeno y otros antagonistas de la seialización de IL- 17F, por ejemplo receptores solubles de U, 17F, que interfieren con la seuialización de la interleucina 17F (IL- 17F), en particular, de IL- i7F humana y sus usos para regular las actividades asociadas con la IL-17F. Los anticuerpos y las molØculas de IL-17F relacionadas que se presentan en este documento, tienen utilidad en ci diagnóstico, pronóstico, control, prevenciOn o tratamiento de trastornos asociados con IL- 17F, por ejemplo, los trastornos inflamatorios (tales como las enferniedades autoinmunes: entre

- 2-

ellas rtritis, artritis reumatoidea, psoriasis, lupus eritematoso sistØmico (LES), escier sis multiple; enfermedades respiratorias: otre ellas, EPOC, fibrosis quistica, asma,/alergia; rechazo de trasplantes, incluso el rechazo do trasplante do órganos sólidos y las /enfermedades a trastornos inflamatorios intestinales tales coma colitis ulcerosa, enfernedad de Crohn).

AnF31

edentes tecno lógicos relacionados
[00 Las citocinas son proteinas solubles secretadas con actividades pleyotrópicas quarticipan en las respuestas iimiunes e infiamatorias; par ejemplo, las citocinas causar diferenciación, reclutamiento u otras respuestas fisiolOgicas en las
ilas blanco, coma la secreción de protelnas caracteristicas de la inflamación. Las)Ciflas se combinan con receptores especfticos de la superficie celular, abriendo ninos do transducción de sefial quo conducen a la activación, proliferación y di erenciación celular. Una citocina de este tipo, la interleucina- 17 (IL-17), o ginalmente conocida coma CTLA-8 se aisló y se clonó a partir de hibridomas urinos, demostrÆndose que poselabomologfa con el marco 13 abierto de lectura del erpesvirus sainiiri linfotrópico T (Rouvier et al. (1993)J. Immunol. 150:5445-56; Yao t al. (1996) Gene 168:223-25; Golstein ot al., Solicitud de Patente Internacional ublicada, N0 W095/01826). Desde entorices, se han identificado cinco citocinas relacionadas, que comparten un 20-50% de bomologia con la IL-17 (ver Moseley et al. (2003) Cytokine & Growth Factor Reviewsl4: 155-74). Con el objeto de indicar a la IL- 17 coma el miembro fundador do la familia de citocinas IL- 17, se la ha designado IL- i 7A (Moseley, supra); so designó a los demÆs miembros: IL- i 7B, IL- 17C, IL- 17D, IL-17E e IL-17F. Los miembros do la familia de la eitocina IL-17 comparten residuos cisteinicos conservados. La IL-17A y, particularmente la IL-17F, que comparten un 50% de identidad, son do interØs; ambas citocinas son inducidas par la IL-23, son coexpresadas par cØlulas T y so considerªn blancos potenciales para las enfermedades autoinmunes mediadas par cØlutas T. En forma similar a Ia IL-17A, los residues cisteinicos conservados en la IL-17F presentan atributos de un motivo cisteinico anudado clÆsico, hallado on las protelnas morfogØnicas óseas, factor do crecimiento transformante beta (TGFf3), factor do crecimiento do nervios (NGF) y factor do

- 3-

crec ento BB derivado de plaquetas (FCDP-BB): (Hymowitz et al. (2001) EMBO J 20:533 -41; McDonald et al. (1993) Cell 73:421-24).

[0004 La IL- i 7F es una protelna secretada 17kD que se clonó a partir de un banco do
cØlula humanas PBMC activadas (SST) (N° do Patentes do EE.UU. 6.043.344 y
6.074 849). Forma un homodimero de 30-35kD unido a un disulfuro (Hymowitz, supra) y, en forma similar a la]L- 17A, se expresa prihcipalmente por cØlulas T activadas (Mos by, supra). No obstante, tambiØn so ha observado la expresión do IL- 17F por mon citos activados, basófilos activados y mastocitos (Kawaguchi et al. (2002) J. 1mm nol. 167:4430-35). La IL-17F induce la expresiân de muchas citocinas y qui iocinas pot maorófagos, cØlulas epiteliales fibroblastos (Moseley, supra).
[00 51 La IL-17F desempefia un papel on las respuestas inflamatorias, en parte al in cit la producción de citocinas inflamatorias causar neutrofflia. EstÆ vinculada con la parición de varias enfermedades autoinmunØs, pot ejemplo, artritis (incluso artritis Leu/matoidea y la provocada por la enfennedad de Lyme), lup us eritematoso sistØmico (L S) y asma (Bettelli y Kuchroo (2005) J.Exp, Med. 201:169-71). Por ejemplo, re ientemente so ha demostrado quo la 1L-23 es esencial para la expansion de una p laciOn de cØlulas T quo so caracteriza, entre otras cosas, por la pmducción de IL - 1 F, que Ia transferencia pasiva de esta póblación do cØlulas T es esencial para tablecer la inflamación especifica do órganos asociada con la autoinmunidad del sterna nervioso central (Langrish et al. (2005) J. Exp. Med. 201:233-40) y quo los r tones deficientes on IL-17 son resisteætes a la encefalon,ielitis autoinmune xperimental (EAE, un modelo animal para hi escierosis m4ltip1e) (Nakae et al. (2003) Immunol. 171:6173-77). La IL-17F es thiica entre las citocinas inflamatorias ya que aumenta la descomposición de proteoglicano y disminuye la sintesis proteoglicano por parte del cartliago articular (Hymowitz, supra). AdemÆs, se ha que se produce un aumento en la expresión do IL-17F en los lavados broncoalveolares (LBA) do pacientes con asnia despuØs de una agresión alergØnica, en comparación con los LBA de pacientes tomados come control (Kawaguchi, supra). AdemÆs, laexpresiOn do ARNm do IL- 17F aumenta en pacientes con colitis ulcerosa y enfemiedad do Crobn (Gurney et al. (2003) GTCBIO Confi Cytokines and Beyond).

Estas

de las
lupus

servaeiones sugieren que el bioqueo de la sefialización de IL- 17F reducirÆla
de la citocina proinfiamatoria y 4isminuith la erosiOn ósea. Por iente, ci camino de seflalización de L- 1F es mi blanco atractivo para ci
nto o prevención de enfermedades infianiatorias en las que los neutrOfilos
os son mediadores criticos de la lesiOn tisular, por ejemplo, durante el desarroilo nfenneclades autoinmunes (como artritis, uc!uso artritis reumatoidea, psoriasis, itematoso sistØrnico, escierosis m4ltip1e), las enfermedades respiratorias (como fibrosis quIstica, asma, alergia), ci rechazo de trasplantes, incluso trasplante de sOlidos, y los trastomos o enfermedades Inflamatorias intestinales (Ell, como uloerosa, enfermedad de Crohn).

[000 Actualmente no es muoho lo que se conoce sobre los receptores para miembros de la familia de la IL- 17. Se ha dernostrado que IL- i7R, el receptor para la IL- i 7A, se ex resa on todos los tejidos exarninados hasta la fecha y que la conjugaciOn de la IL-17R or parte de la IL- i 7A generalmente induce citocinas proinflamatorias mediante la activ dOn de NF-KB (Moseley, supra). Se han iclentificado otros cuatro receptores que corn arten homologia de secuencia parcial con la IL-17R: 1) IL-17RH1 (tambiØn 11am da IL- 17RB), 2) proteina de tipo receptor ie IL- 17 (tambiØn Ramada IL- I7RL o IL-i RC), 3) IL-17RD (tarnbiØn Ramada SEF d IL-17RLM) y 4) IL-17RE (Moseley,

:"p,ea

). De estos cuatro receptores adicionales, s*lo Ia IL-17RH1 ha demostrado ligarse citocinas IL- 17, es decir, IL- 1713 e IL- 17E;’ sin embargo, no se ha dernostrado ain
la nción de IL, I 7B e IL- I 7E al ligarse a IL- 17RH1 (Shi et al. (2000) J. Biol. Chem
27:19167-76; Lee et al. (2001) J. Biol. Chem.:276:1660-64). Flasta la fecha, no se ha in rmado sobre ci hallazgo de receptores para la 1L- 17F. Por ende, no so ha podido uti izar la seiializaciOn de IL-17F para la prevnciOn o tratamiento de enfermedades, au que tal vez desempefie un papel importante on la homeostasia de tejidos (por
ej plo, los tejidos articulares) y la progresiOn de varias enfermedades (como artritis,
as a, alergia, EPOC, fibrosis quistica, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, entre
o as). El presente invento resuelve este problema al identificar y actuar sobre
p icipantes claves en ci camino de transducciOn de serial de la protelna IL-i 7F.

[00071 1

- 5-

RESUMEN DEL INVENTO

finalidad del invento es la identificacón de componentes del camino de
ción de la IL-i 7F, por ejemplo, IL-17F y su receptor, y actuar sobre estos nentes en mØtodos para el tratantiento de trastornos relacionados con la sefación de IL- i 7F. Estos trastornos asociados’ eon la IL- 17F y los relacionados con el ento de la sefalización de IL- i 7F incluyen, entre otros, trastornos infiarnatorios, coenferniedades autoinmunes (ariritis, arritis reumatoidea, psoriasis, lupus eritoso sistØrnico, escierosis multiple), enfermedades respiratorias (EPOC, fibrosis quIa, asma, alergia), rechazo de trasplantes,’ incluso el rechazo do trasplante de

orgs sOlidos y enfermedades inflamatorias intestinales (colitis ulcerosa, enfermedaddohn).

[00 81 De esta manera, la investigación que apoya el presente invento ofrece evidencias de ue h IL- i 7F actüa como mediadora de la destrucciOn de proteoglicano y de las res uestas inflamatorias al ligarse a IL- 17R o IL- 17RC. La determinaciOn de la IL- 17R y 1 IL- 17RC como receptores do la IL- 17F sefiala a estas molØculas como claves para el t atamieiito de trastornos relacionados con la seflalizaciOn de IL- i 7F.

[0 09] En este docurnento se proporcionan antagonistas de la sefializaciOn de IL- 17F, in luso, entre otros, polinucleotidos inhibidores do IL- 17F, polinucleOtidos inhibidores do IL-17R, polinucleOtidos inhibidores de IL-17RC, polipØptidos solubles compuestos d fragmentos de union do IL-17R o IL-17F, polipØptidos solubles compuestos de grnentos de uniOn do IL-17RC o IL-1717, anticuerpos inhibidores contra IL-17F, ticuerpos inhibidores contra IL- 17R, anticuerpos inhibidores contra IL- 17RC y olØculas antagonistas pequefias. Los ejmplos preferidos do antagonistas de s flalización de IL-17P incluyen ARNsi diriidos a 1L-17R e IL-17RC, proteinas do siOn solubles compuestas de IL- 17R e IL- 17RC (o fragmentos de uniOn de IL- 17F) y ticuerpos inhibidores (es decir, antagonistas) do IL- 17F. En otra realizaciOn preferida ci invento, un antagonista de sefialización do I1,17F, por ejemplo, el ARNs1 dirigido ontra IL- 17R o IL- 17RC, las proteinas de fusiOn solubles coinpuestas de IL- 17R o IL-7RC (o fragmentos de uniOn do IL-17F) o los anticuerpos inhibidores de IL-17F educe la biodisponibilidad do IL-17F o la capacidad do NF-?B para activar los genes do respuesta a NF-?B.

100101

y la II

- 6-

demÆs,sobre la base de la similitud estructural y de secuencia entre la IL- 17A
17F, los inventores desarroilaron la hipótesis y demostraron la forznación de
nuevos heterodimeros IL-17A/IL-17F. Al probar la existencia de heterodimeros
IL- 17 IL, 17F, los inventores son los primeros on demostrar que la IL-21 aumenta la
produ ción de homodimeros de IL-17A, homodineros de IL-17F y heterodimeros de
EL-17 IL-17F, y sugieren que los efectos asociados con la union de la IL-21 con la IL-
21R y la activación de la IL-2 IR tal vez se deba, al menos en parte, a Ia seflalización de
. IL-17 Los inventores tambiØn son los primeros on aislar homodimeros de IL-17A, homo Imeros de IL-17F y heterodimeros de flhi-17A/IL-17F a partir de una fuente
nat I de estas citocinas, por ejemplo, cØlulas T ctivadas. Por consiguiente, el invento
tamb en proporciona mØtodos para mitigar los efectos asociados con la uniOn de la IL-
21 c n la IL-21R y su activación, por ejemplo, pr inhibición de la seflali.zaciOn de IL-
17A o IL- i 7F. AdemÆs, el invento proporciona homodimeros naturales (es decir, no
reco binantes) de IL- 17A, homodimeros naturales de IL- i 7F y heterodimeros naturales
de I 1 7AJLL- 17F, asI como mØtodos para aislar y actuar sobre estos, por ejeinplo, en
met dos para el tratamiento de trastornos asociados con el aumento de b sefializaciOn
de -17F o de trastomos asociados con la de IL-21 con IL-21R y su activaciOn.
En este documento so presentan ademÆs homodimeros recombinantes de IL- 17A, ho odimeros recombinantes de IL- i 7F y heterôdimeros recombinantes de IL- 17A/R,-

17

7AJIL-

, asi como mØtodos para aislar heterodimeros de IL- 17A/IL- 17F (recombinantes
na rales) bÆsicamente sinhomodimeros de IL- 17A y homodimeros de IL- i 7F.

[0 111 Los mØtodos quo tienen como objetivo Ia seflalizaciOn do EL-17F pueden incluir p0 inucleOtidos do IL-17F, IL-17R o polinucleOtidos de IL-17RC (incluso p0 inucleOtidos tales como antisentido, ARNsi y aptÆmeros), polipOptidos y sus como antagonistas de la seflalización do IL- 17F. AdemÆs, tambiØnpueden anticuerpos eapaces de inliibir la interacciOn entre la protelna IL, i 7F (ya sea homodimero de IL› 17F o como heterodimero do IL- 17AIIL-17F) con sus

El invento se relaciona tambiØu con el uso do las molØculas presentadas on este
on mØtodos de seleceión de compuestos de prueba capaces de ubicar ci

M,

los

- 7-

de seiialización de IL-17F, y de diagnosticar, pronosticar, monitorizar o tratar
omos relacionados con la seflalización de IL- i 7F.

[0013 En una realización, el presente invento proporciona tin m&odo para seleccionar
con estos de prueba capaces de antagonizar la seftalización de IL- 17F que comprende
los p sos siguientes: poner en contacto una muesta que contiene IL- 17F e IL- 17R con tin c mpuesto y determinar si la interacción de IL- 17F con IL- 17R en la muestra ha dism nuido on comparaeión con la interacción d IL- 17F con IL- i 7R en una muestra
que o estuvo en contacto con el compuesto y en la que dicha reducción en la
inter cción de IL- 17F con IL- i 7R en la muestra on contacto con ci compuesto identifica
al mpuesto conio inhibidor de la interacci6n enire IL-17F e IL-17R y puede
anta onizar la seæalización de IL-17F. En otra realización, ci invento proporciona un met do similar de selección relacionado con IL- 17RC.

[0041 En otra realizaeión, ci invento proporciona tin metodo para diagnosticar un tra tonio relacionado con el aumento de la se1Ialización de IL -17F on un sujeto, que
co prende los pasos siguientes: detectar una cantidad medida de un producto genØtico
de se1alizaci6n de IL-17F on una muestra tomada del sujeto y comparar Ia cantidad m dida con una cantidad normal del mismo producto genØtico de seflalización de IL -
17 on una muestra testigo. Una cantidad trtedida signiflcativamente superior a la
c tidad normal proporciona una indicación positiva on ci diagnóstico de tin trastorro
r acionado con un aumento on la seflalizaión de H_,1 7F. En otra realización, ci tr storno se selecciona a partir del grupo quo:comprende enfermedades autoimmmes, fermedades respiratorias y enfermedades inflamatorias intestinales En otras r alizaciones, ci producto genØtico de sefla1iaci6n de IL-17F es tin producto genØtico e IL- 17F, tin producto genØtico de IL-17R o un producto genØtico de IL-17RC.

00151 En otra realización, el invento proporciona un mØtodo para tratar a tin sujeto que orre ci riesgo de contraer o al que se Ic ha liagnosticado un trastorno relacionado con 1 aumento de la seflaIizaión de IL -17F y que incluye la admiuistración de una cantidad erapØuticamente eflcaz de tin antagonista dc la seiiaiizaeión de IL- 17F al sujeto. En otra realización, ci antagonista de la sefialización se sciecciona a partir del grupo que comprende polinucleótidos inhibidores de IL-17F, polinucleótidos inhibidores de IL-

17R,i
union
IL- 17
antic
reaiiz
de

sus

las

ilinuc1e6tidos inhibidores de IL- 17RC, po1ipptidos solubles y sus fragmentos de IL-17R o IL-17F, polipØptidos solubles y sus fragmentos de umOn a IL-17RC o anticuerpos inhibidores anti-IL-17F, anticuerpos inhibidores anti-IL- 17R,
erpos inhibidores de IL-17RC y molØculas antagonistas pequefias. En algunas ciones, ci antagonista de la sefialización de IL- i 7F es un polinucleótido inhibidor
17R o un poiinucleOtido inhibidor de IL- 17RC. En algimas otras realizaciones, ci cleótido inhibidor es un ARNsi seleccionadł a partir del grupo que comprende las cias nucleótidas presentadas en las ID DE SEC N° 17 a 32. En algunas ciones, el antagonista de la sefialización de H, 17F es un polipØptido soluble con Lgmentos de uniOn a IL- i 7R o TL- i7F o d uniOn a IL- 17RC o IL-i 7F. En otras ciones mÆs, ci polipØptido soluble tiene la secuencia aminoÆcida presentada en
DE SEC N° 34 0 ID DE SEC N° 35. algunas otras realizaciones, (1) ci cieOtido inbibidor de IL- 17F comprende la secuencia de nucleótidos presentada
en D DE SEC N° 1, o una secuenc ia cornplementaria a dicha secuencia de nucieOtidos, o fragmento de la ID DE SEC N° 1, o unó de sus ARN equivalentes, y donde la ex resiOn del polinucleOtido inhibidor en una icØlula da lugar a la disminución de la ex resiOn de IL-i 7F; (2) el polinucleótido inhibidor de IL, i 7R comprende la secuencia d nucleOtidos presentada en la ID DE SEC \T 5 0 una secuencia complementaria a di ha secuencia de nucleOtidos, o un fragmento de la ID DE SEC N° 5, o uno de sus equivalentes y donde la expresiOn del polinucleOtido inhibidor en una cØlula da
I gar a la disminuciOn de la expresiOn de IL- 17R y (3) el polinucleOtido inhibidor de 17RC comprende una secuencia de nuc1etidos seleccionada a partir del grupo que omprende las secuencias de nucleOtidos preentadas, o una secuencia complernentaria la secuencia de nucleOtidos seleccionada a partir del grupo que comprende las ecuencias de nucleOtidos presentadas en ID DE SEC. N 7, ID DE SEC N° 9, ID DE EC N° 11, ID DE SEC N° 13 e ID DE SEC N° 15, o un fragmento de la secuencia de ucleótidos seleccionada a partir de las secuncias presentadas en ID DE SEC N° 7, ID DE SEC N° 9, ID DE SEC N° 11, ID DE SEC N° 13, e ID DE SEC N° 15, o uno de sus ARN equivalentes, y donde la expresiOn del polinucleOtido inhibidor en una cØlula da lugar a una disminución de la expresiOn de IL-i 7RC. En aigunas realizaciones, ci trastorno relacionado con ci aumento de la sefializaciOn de IL- i7F es un trastorno

En algunas otras realizaciones, el trastorno infiainatorio se selecciona a
partir del grupo quo comprende una enfermedad autoinmune, una enfennedad respir toria y una enfermedad infiamatoria intestinal. En otras realizaciones, el trastorno
infi atono es una enfermedad autoirimune y la onfertmodad autoinmune se selecciona
a p ’r del grupo quo comprende artritis (incluso artritis reumatoidea), psoriasis, lupus
erite atoso sistØmico y escierosis multiple. En otras realizaciones, el trastorno infla atorio es una enfermedad respiratoria y la enfermedad respiratoria es fibrosis quis ica o el trastorno intlamatorio es una enfermdad infiamatoria intestinal.
[00 61 En otra reaiización, el invento comprende ademÆs administrar al sujeto una can dad terapØuticamente efioaz de al menos agente terapØutico adicional. En otra rea ización, al menos un agente terapØutico adicional se selecciona a partir del grupo
qu comprende inhibidores do citocina, inhibidores do factor del crecimiento,
unosupresores, agentes antiinflamatorios, inhibidores metabólicos, inhibidores de imas, agentes citotóxicos y agentes citostticos. En otra realización, al menos un
a ente terapØutico adicional se selecciona a partir del grupo que comprende tagonistas de FNT, agentes anti-FNT, antagonistas de IL-12, antagonistas de IL-15, gonistas de IL- 17, antagonistas de 1L-18, antagonistas do IL-22, agentes agotadores cØlulas 1, agentes agotadores de cØluias 8, cielosporina, FK-506, CCI-.779, ercept, infliximab, rituximab, adalimuinab, prednisolona, azatioprina, oro, salacina, ciomquina, hidroxicloroquina, minociclina, anakinra, abatacept, Dtrexato, leflunomida, rapamicina, anÆlogos do rapamicina, inhibidores do Cox-2, bidores do cPLA2, FAINE, inhibidores do p38, antagonistas de 87,1, 87,2, ICOSL,
S o CD28 y agonistas de CTLA4.
[00171 En otra realización, el invento proporciona un mØtodo para inhibir la capacidad do NF-KB para activar promotores quo respondan a NF--KB en una población celular o un sujeto, quo comprende administrar un antagonista do la seiialización do IL- i 7F a la población do cØlulas o al sujeto. En otra rcalización, el invento proporciona un mØtodo para inhibir una bioactividad do IL-17F en una población celular 0 un sujeto, cuyo mØtodo comprende administrar un antagonista do la sefialización de IL -17F a la población celular o al sujeto. En otra realización, la bioactividad de IL -17F so

414

selecci/Inla a partir del grupo que compren4ie diferenciación de neutrófilos, reclutmiento de neutrófilos e inducción de citocina.

[OO18 En otra realización, el invento proporciona, una. composición farmacØutica que comp-ende un antagonista de la sefialización de IL-I 7F y tin agente portador farmcØuticamente aceptable. En otra reaiización, ci invento proporciona un adyuvante de vcuna que comprende un antagonista de la sefialización de IL-17F y in antigeno seiecionado a partir del grupo que comprende un autoantlgeno, un alergeno, un aloaitIgeno y sus fragmentos. En otra realización, ci invento proporciona anticuerpos aisi dos capaces de conjugarse especificarnente con secuencias de aminoÆcidos rela ionadas con el presente invento, inoluso las presentadas en las ID DE SEC N° 8, 10, 12, 14 y 16; on algunas realizaciones, ci ariticuerpo antagoniza la sefla1izai6n de

IL- 7F.

[0 191 En otra realización, el invento proporciona un anticuerpo aislado capaz de unitse es ecIficamente a]a proteina de IL-17F y otras realizaciones donde la proteina de IL-1 se deriva de un ser humano o de tin primate; donde la proteina de IL-17F es itimØrica; donde la proteina de IL-17F es un homodimero de IL-17F 0 tin h terodImero de IL-17F; donde el heterodimero de IL-17F es de IL-17A/IL-17F; y d nde el anticuerpo inhibe la bioactividad de IL-17F.

0201 En otra realización, ci invento proporciona los mØtodos antes identificados, onde la sefialización de IL -17F o la bioàctividad de IL-17F es mediada por ci omodimero de IL- 17F, un heterodimero de:IL 17F o tanto pot tin homodimero de IL-17F como pot tin heterodimero de EL- I 7F, inoluso donde ci heterodimero de IL- 17F es IL- 17A/IL-. 17F.

[00211 En otra realización, el invento proporciona la composición farmacØutica antes identificada o ci adyuvante de vacuna identificado anteriormente, donde ci antagonista de la sefialización de IL, I 7F antagoniza ci homodimero de IL-. 17F, un heterodimero de IL- i 7F o tanto con tin homodimero de IL-I7F como con tin heterodiniero de IL- i 7F.

[0022] En otra realización, ci invento proporciona tin rn&odo pant inhibit al menos una actividad asociada con la sefialización de IL -21 que comprende antagonizar la sefiaiización de IL- 17F. En otra realización, ci invento proporciona un mØtodo pÆra

inhibir! al menos una actividad asociada con

11-

Ta sealizaciOn de IL-23 que comprende
antagc/nizar la sefialización de IL-17F. En algunas realizaciones adicionales, la seæa1iación de IL- i 7F es mediada por un homodfinero de IL- i 7F, un heterodimero de IL-177 o tanto par un homodimero de IL-17F cqmo por un heterodimero de IL-17F, incluo donde ci heterodimero de IL-17F es de IL- i7AJTL_i7F.

[002] En otra realización, el invento proporciona un mØtodo para la purificación de prot na natural de II, i 7A que comprende: activació n de cØlulas T on medios; e noprecipitación de proteina de IL-17A dese los medios. En otra realizaciOn, ci
to proporciona un mØtodo para la purificación de la proteina natural de IL- i 7F que
co rende: activación de cØlulas T en medios;:’e inmunoprecipitación de proteina de IL- i 7F desde los medios. En algunas otras realizaciones, Sc proporcionan tales mØtodos, don e la, proteina de IL-17A es un homodimero de LL-17A, un heterodimero de H, 17A o nto tin homodimero de 11,17A como un heterodimero de IL-17A o donde Ia pro elna de IL- i 7F es un homodimero de IL- I 7F, un heterodimero de IL- i 7F o tanto tin ho odimero de IL- 17F corno un heterodimero dc IL- 17F; y donde el heterodimero de 17A o IL-17F es de IL- I7AIIL-17F. En otrarealización, los medios consisten en IL-

21oIL-23.

10 241 En otra realización, ci invento proporciona una proteina de IL-17F aislada, d ride la proteina de IL- 17F es un homodimero de IL- 17F o tin heterodimero de IL- 17F, d nde la proteina de IL- 17F es aislada a pardr de una fuente natural; donde la fuente n tural es al menos una cØlula T. En otra realización, ci invento proporciona una p oteina de IL-17A aislada, donde la proteina: de IL-17A es tin homodimero de IL-17A un heterodimero de IL- i 7A; donde la proteina de IL- i7A es aislada a partir de una ente natural; donde la fuente natural es al mnos una cØlula T.

00251 En otra reaiización, el invento proporciona tin mØtodo para inhibir al menos una etividad asociada con la seflalización de FL -17A, que comprende adniinistrar un tagonista de IL-17F.

[00261 En otra realización, ci invento proporciona un mØtodo para aislar heterodimeros de IL-i 7A/IL- 17F prÆcticamente sin homodimeros de IL- i 7A y bomodimeros de IL-17F que comprende: (a) expresar una proteina de fusiön de IL-17A y una proteina de

fusiInde IL-17F on cØlulas anfitrionas cultivadas en medios, donde la proteina de fuside IL-i 7A comprende una proteina de IL- 17A o su fragmento ligado a una
prim marca de afiriidad y donde la proteina de fusiOn de IL-17F comprende una
prota de IL- i 7F o su fragmento ligado a una segunda marca de afinidad; (b) permitir
que cØlulas anfitrionas secreten Ia proteina de fusion de IL- 17A y la proteina de
fuside IL-i7F dentro de los niedios; (c) coocar los medios sobre una primera
colua de afinidad en condiciones m reductoras para que la proteina de fusion de IL-S17Ase una a la primera columna de aflnidad (d) eluir la proteina ligada desde la, p era columna de afmidad on condiciones no reductoras; (e) colocar el eluyente
obt nido del paso (d) sobre uria segunda columna de aflnidad en condiciones no
red ctoras para que la proteina de fusiOn de U- 17F se una a la segunda columna de
idad y (f) eluir Ta proteina ligada de la segunda columna de afinidad en condiciones
no reductoras, donde el eluyente obtenido del paso (f) contiene tanto la proteina de
flu ion de IL- i 7A como la proteina de fusiOn de IL- i7F en estructura de heterodImeros de IL-i 7A/IL- 17F. En otras realizaciones, se proporcionan variaciones de este mØtodo.
E otra realizaciOn, el invento proporciona un 1terodimero de IL-17A/IL-17F aislado
d acuerdo con estos diversos mØtodos.

BREVE DESCRIPCION DE LOS GRAFICOS

[0271 En la Figura 1 se presenta la transactivaciOn de indicador mediado por NF-?B (ctividad de luciferasa relativa; ordenadas) en (A) condrocitos humanos primarios y) condrocitos porcinos primarios cultivads en diversas conceutraciones (ng/ml) de
- 17A o IL-17F (abscisas).

00281 En la Figura 2 se presenta la concentración (pg/mi; ordenadas) de citocinas (IL-6, IL-8, MCP-1 o GRO-a; abscisas) de dos paciertes (P1, P2; abscisas) en el material sobrenadante recogido de sinoviocitos de tipo flbroblastos humanos en medio de cultivo (testigos; 0) o en presencia de 20 ng!ml de IL-17F (IL- 17F;).

[00291 La Figura 3 exhibe la concentraciOn (pg/nil; ordenadas) de citocinas inflamatorias (IL-6, JE (CCL2), KC; abscisas) en el material sobrenadante recogido de fibroblastos pulmonares murinos on medios de cultivo (0 ng/ml de IL- i 7F; 0), o con 1 ng/ml ((), 3,3 ng/ml ([Di), 10 nghnl (), o 30 ng/ml () de IL-17F.

- 13- 3

[00301 E0030 La Figura 4 muestra la unión (DE. 450 Inn; ordenadas) de concentraciones en aume to de IL-17F humana (paneles izquierdos) o de IL-17A humana (paneles derec os) (abscisas) con (A) IL-17R-IgG (paneles superiores) o (B) IL-17RC-IgG (pan es inferiores) medidos pot ELISA. Tambin se observan valores de CE50 pam cada i teracción entre receptor/citocina.

E003 I En la Figura 5 se presenta la concentraci6n de GRO-a (pg/mi; ordenadas) en el mat rial abrenadante recogido de fibroblastos himanos cultivados solos (medios; ) o con concentraciones en aumento, (.g/nil; absciss) de una proteina de fusion JL- 1 7R-

IgG (hl7R.Fc; ), una proteina de fusion IL-17C-igG (h17RH2.Fc;), una protelna Ig testigo (hIgGi;?), un anticuerpo anti-IL- 17R (ahIL17R; 0) o un anticuerpo tes igo (IgG de cabra;?) on presencia de (A) 0,5 ng/nil de IL- 17A (paneles izquierdos) o) 20 ng/ml de IL- 17F (paneles derechos).
[0 321 La Figura 6 demuestra la capacidad de:108 anticuerpos anti-IL-17F humana pam ibir la uniOn de IL-17F con IL-17R (DE 450 nm; ordenadas) en presencia de c ncentraciones en aumento (xg/ml; abscisa) de uno de los seis anticuerpos anti-
- 17F siguientes: anti-IL-17F-01 (J), anti-IL-17F-02 (), antilL-17F-03 (’1), anti-
- 17F-05 (), anti-IL-17F-06 (S) y anti-IL-17F-07 (?).

[0331 La Figura 7 demuestra la capacidad do los anticuerpos anti-IL- 17F humana para bir la uniOn de IL- i 7F con IL- 17RC (E 450 nm; ordenadas) en presencia de oncentraciones on aumento (j.tg/ml; abscisas) de cada uno de los seis anticuerpos anti-
- 17F siguientes: anti-IL-17F-01 (U), anti-IL-17F-02 (), anti-IL-17F-03 (?), anti-
- 17F-05 (), anti-IL-17F-06 (), y anti-IL-17F-07 (?).

100341 En la Figura 8 se presenta la concentración de GRO-c (pg/mi; ordenadas) on ci material sobrenadante recogido de fibroblastos humanos en eultivo de 20 ug/nil de IL- i 7F y concentraciones en aumento 6g/ml; abscisas) de (panel izquierdo) anti-IL-17F-01 (aIL-17F-0l), anti-IL-17F-02 (aIL-17F-02) o anti-IL-17F-03 (aIL-17F-03) y (panel derecho) an6IL-17F-05 (alL-17F-05), anti-IL-17F-06 (aIL-17F-06) o anti-IL-17F-07 (alL-17F-07) o anticuerpos testigos mIgGi.

- 14-

[0035] En la Figura 9 se observa la, transactivaoióri de indicador mediada pot NF-?B (Activ dad relativa de luciferasa; ordenadas) en condrocitos porcinos primarios en medio de cultivo solamente (ninguno), en 100 ng/ml de IL- 17A (IL-17A(i00 ng/ml)), on 1 0 ng/ml de IL-17A en presencia do uria proteina do fusion IL-17R-IgG (IL-i A+IL17R/Fc), en 100 ng/ml de IL-17A en presencia de un anticuerpo anti-IL-17F (ILl A+anti-IL1717), on 100 ag/mI do IL-17A Ien presencia do IgG murina testigo (IL- 7A+IgG murina), en 500 ng/ml do IL- 17F (it- 17F(500 en 500 ng/ml de IL-i F en presencia de ma protelna do fusiOn IL- 17R-IgG (IL- 17F+IL1 7RIFc), en 500 / I de IL-17F en presencia do un anticuerpo’ anti-IL-17F IL-17F+antiIL17F) o en 500 ng/ml IL- i 7F on presencia do IgG murina testigo (IL-i 7F+IgG murina).
100 61 En la Figura 10 so presenta la concentraciOn (pg/mi; ordenadas) do citocinas (IL 6, IL-8 o GRO-a; abscisas) do dos paeidntes (P1, P2; abscisas) en el material so renadante recogido de sinoviocitos de tipo fibroblasto humano cultivado en pr sencia de 20 ng/ml do IL- 17F (IL- 17F; 0), in anticuerpo isotipo testigo (Isotipo Ab; 0), ticuerpo anti-IL-17F-01 () o anticuerpo anti-IL- 17F-07
[0371 La Figura 11 muestra la detecciOn (DE 450 inn; ordenadas) do homodimeros de
- 1 7A (IL- i 7A/A; abscisas), homodimeros do IL-. 17F (IL-i 7F/F; abscisas) o eterodimeros de IL-17A/IL-17F (IL-17A/F; abscisas) usando formatos ELISA specIflcos para la detecciOn do (A) proteIna11-17A (inciuso homodimeros de IL-17A heterodimeros do 1L-17A) B) Proteina IL.-17F (incluso homodimeros do IL-17F y eterodinieros do IL- i 7F) o (C) heterodImeros de IL- i7A/IL- 17F.

[0038] La Figura 12 demuestra la coricentraciOn (citocina producida (pg/mi); ordenadas) do (&) IL-17A o 3) IL-17F en medios aislados do cØlulas T sometidas a activación primaria on presencia do anticuerpos anti-CD3 ligados a perlas, concentraciones en aumento do anticuerpos antiCD28 (an6CD28 (ng/ml); abscisas), y en ausencia (0) o presencia de IL-21 (9) o IL-23 (0).
[0039] La Figura 13 demuestra la coneentraeiOn (citocina producida (pg/mi); ordenadas) do IL-17A () o IL-17F (0) on medios aislados de cØlulas sometidas a aotivación secundaria bajo las siguientes condiciones do estImulo (abscisas): IL-23 solamente (IL-.23); IL-21 solamente (IL-21); anticuerpos anti-CD3 ligados a perlas y

anticurpos anti-CD2S (CD3/CD28); IL-23, anticuerpos anti-CD3 ligados a perlas y antic4rpos anti-CD28 (IL-23/CD3/CD28); IL-21 anticuerpos anti-CD3 ligalos a perlas y antiuerpos anti-CD28 (IL-21/CD3/CD28); o medios.
[004(La Figura 14 demuestra la deteeción (DE 450 nm; ordenadas) de homodimeros de it1- 17A, homodimeros de IL- 17F o heterodimeros de IL- i 7A/)L- 17F en medios sin dilui (puros) o diluidos (1:10) obtenidos de cØluas T sometidas a activación primaria (C 1) o a repetición del estImulo (CM2) (abscisas) usando formatos ELISA esp cificos para la deteceión de (A) proteina de IL- 17A (incluso homodimeros de IL- 7A y heterodimeros de IL-17A), (B) protefiia de IL-17F (incluso homodimeros de IL- 7F y heterodimeros de IL-17F) o (C) heterodimeros de IL- 17AIIL-17F.
10 411 En la Figura 15 se presenta un anÆlisisde inmunotransferencia realizado con un an cuerpo policlonal de conejo anti-IL-17F h.pnano para detectar inmunoprecipitados a ML-17F-01 humano, a partir de 500 p.1 4e medios condicionados obtenidos de c ’lulas T sometidas a activación secundaria. Los testigos consisten en homodirnero de
- 17F (segunda banda) preparado como so dscribe en el Ejemplo 5.3 u homodimeros IL- i7A (quinta banda) adquiridos de R&D Systems (Minneapolis, MN). El estândar
e peso molecular se muestra on la primera banda. Las posiciones do los homodimeros e IL- 17A e IL- i 7F y de los heteroclimerÔs de IL- 17F/IL- 17A estÆn indicadas por echas.

100421 La Figura 16 es el resultado de un anÆlisisde irmiunotransferencia realizado con anticuerpo de cabra conjugado con biotina anti-IL-17A humana para detectar inmunoprecipitados anti-IL-i 7A-02 humana a partir de 500 p.1 de medios condicionados obtenidos de cØlulas T sometidas a activación secundaria. El testigo (banda 2) consiste on homodimero de IL-17F preparado como so describe en el Ejemplo 5.3. El estÆndar de peso molecular se presenta en la banda 1. Las posiciones de los homodimeros de IL-17A e IL-17F y do los heterodimeros do IL- l7F/]L-17A estÆnindicadas pot flechas.

100431 La Figura 17A presenta inmunoprecipitados anti-IL- 17F (bandas 2 a 7) o inmunoprecipitados an6IL-17A (bandas 8 a 10) inrnunosondeados con anticuerpos anti-IL- 17F. Los inmunoprecipitados se obtuvieron a partir do los medios condicionados (MC) de cØlulas COS con expresión excesiva de IL-17A (bandas 2 y 8),

A

Nj)

IL-I
17A

IL-1

e

WA

7F (bandas 3 y 10), IL, 17A e 1L-17F (bandas 4y 9), homodimero purificado do L-anda 5) u homodimero purificado do IL- i 7F (bandas 6 y 7). Los testigos ("AlA
fi ado", banda 5, y "F/F purificado", bandas 6 y 7) consisten en homodimeros inantes purificados de IL-17A e IL-17F, cono se describe on el Ejemplo 5.4. El
ti do peso molecular so presenta en banda 1. Las posiciones do los to ’meros do lip 17A e IL- 17F y de los he rodimeros de IL-i 7F!IL- I 7A estÆn s por flechas.

La Figura 17B presenta inmunoprecipita4os anti-IL-17A (bandas 2 a 4) o anti-
F (bandas 5 a 7) inniunosondeados con anticuerpos anti-IL- 17A. Los noprecipitados so obtuvieron a partir do los medios condicionados (MC) de cØlulas con expresión excesiva de IL-17A (bandas 3 y 5), IL-17F (bandas 2 y 7) o IL-17A
- 17F (bandas 4 y 6). El estÆndarde peso molecular se presenta en la. banda 1. Las ciones de los homodimeros do IL- i 7A e L- 17F y de los heterodimeros do IL-ilLi7A estÆnindicadas por flechas.

51 La Figura 18 es un diagrama que muestra un mØtodo de purifieación de rodImeros recombinantes de IL-i7F/IL- 1 7A sustancialmente libres de todimeros de IL-17A e IL-17F. El mØtodo emplea IL-17A e IL-17F con dos adores de afinidad diferentes y utiliza dos QDlumnas de afmidad separadas y tenciales para aislar los heterodimeros do IL- i 7F/IL- 17A.

61 La Figura 19A muestra quo los hetero1imeros recombinantes puriflcados de IL-TL- 17A (X), sinijiares a los homodimeros do IL- 17A () e IL- 17F 0), estimulan o.)ncentracjones do GRO-u (pg/mi) on los medios de cultivo de cØlulas BJ. La ira 19B muestra que el cotratamiento de cultivos de BJ con anticuerpos anti-IL- 17A
o anti-IL-17A en combinación con anticuerpos anti-IL-17F), pero no con uerpos para IL-17F solos (0), anula ci estImulo do heterodimeros de IL-i 7F/IL-7A de las concentraciones do GRO-.x. Los testigos consisten en cultivos con medios que carecen de anticuerpos pam la IL, 17F y la IL-17A (X).
[00471 La Figura 20 es una tabla que resume los datos do espectromeiria de masa MALDI-TOF para masas do pØptido triptico, preparado por digestion do homodimeros de IL- i 7F, homodimeros do IL- i7A y heterodimeros do IL-i 7F/IL- 17A. La primera

)9k

- 17-

colunna de la tabla muestra el origen del fragmento peptidico analizado, la segunda (Es etura) muestra la secuencia del fragmento peptIdico, la tercera (PM Cal) muestra el pe o molecular ealculado del fragmento, la cual-ta muestra la relación calculada entre m y carga (valor mlz) del fragmento (Calculado) y la quinta columna muestra la rela ion real entre masa y carga (valor mlz) (Observado) segün se detenninó mediante esp ctrometr{a de masa.

[0 481 La Figura 21 muestra que los anticuerpos anti-IL-17F humana pueden inhibir p cialmente la actividad biológica de la IL -17F de primates. Las Figuras 21A y 21B m estran que las cØlulas BJ estimuladas con 1L47F humana o de primate (macaco) p esentan concentraciones en aumento de GRO-a que responden a concentraciones en a ento de IL-17F. La Figura 21A muestra que los anticuerpos anti-IL-17F-0l (]) y ti-IL-17F-07 (X) reducen la capacidad de la IL-17F humana () para estimular las de GRO-a. En forma similar, la, Figura 21B muestra que los
/nticuerpos anti-IL-17F-01 (Q) y anti-1L-17F-07 (X) disminuyen la capacidad de Ia IL-17F de primate () para estimular las concentraciones de GRO-c, aunque en menor grado que cuando los anticuerpos reducen la actividad biolOgica de IL- i 7F humana. [0049] La Figura 22 demuestra que el trataniiento con EL- i 7F aumenta la expresiOn de ADAMTS-4 (Agrecanasa 1) en los condrocitos obtenidos dc donantes humanos y que ci tratamiento eon anticuerpos anti-IL-17F anula este estimulo. Se trataron condrocitos cultivados con 250 ng/ml de IL-17F, 250ng/ml de IL-17F y 25 gg/ml de anti-I1.4713, 25 j.g/ml de anti-]L-17F, 250 ng/mI de IL-17F y 25.tg/ml de IgGi testigo, o con 25 tg/m1 de IgG1 testigo (abscisas), y se midieron las concentraciones transcriptas de Agrecanasa 1 medidas por PCR en tiempo real (expresadas como unidades TAQMANfi; ordenadas). Se usaron las concentraciones de expresiOn GAPDH como norrnalizador.

[00501 La Figura 23 detnuestra que ci tratamiento de las cØlulas BJ con ARNsi dirigido a transcriptos de IL-17R e IL-i 7RC reduce la capacidad de la IL-17F y de la IL-17A para aumentar las concentraciones de GRO-c. Figura 23A Taqman = % de reducciOn en las concentraciones de transcriptos de IL-17R en cØlulas tratadas con ARNsi a IL-17R; IL-17F = % reducción en la capacidad de la IL-i7F para estimular las

- 18-

conce traciones de GRO.-a en cØlulas tratadas con ARNsi a IL-17R; I1-17A = % de reduc ion en la capacidad de la IL-17A para estirnular las concentraciones de GRO-a on cØ as tratadas con ARNsi a tL- 17R. La Figura 23B muestra que ci tratamiento de las c ’lulas BJ con ARNsi dirigido a transcriptos de IL- i 7RC reduce ii capacidad de la IL-i F y de la IL-17A para aumentar las concentraciones de GRO-c. Taqman = % de red ción en las concentraciones de transcriptos de IL- 17RC en cØlulas tratadas con si a IL-17RC; IL-17F = % de reducciOii en la capacidad de la IL-17F para esti ular las concentraciones de GRO-cL on cØlulas tratadas con ARNsi a IL- 17RC; IL-17 = % de reducción en la capacidad de la IL-17A pant estimular las concentraciones de GRO-oc en cØlulas tratadas con ARNsi a IL-17RC. La Figura 23C presenta varias m lØculas de ARNsi del presente invento (ID DE SEC N° 17-32) dirigidas a p linucleOtidos de ARNm relacionados con ese invento (es decir, IL- 17R e 1L- 17RC). 0511 La Figura 24 muestra ci prornedio de, aumento de cambio (tejidos lesionados I o lesionados, no afectados) de la expresión do transcriptos de IL- 17F e IL- 17A en 48 pares de nluestras de biopsia tisular, tomadas de pacientes con psoriasis. Anibas oncentraciones de transcriptos de IL- i 7A e IL- 17F aumentan en los tejidos de lesiones psoriÆsicas con respecto al tejido no afectado. Los valores P obtenidos de pruebas t

pareadas son los siguientes: IL-17A p= 2,8 Y, 10.13, IL- 17F pll x 10.
[00521 La Figura 25 presenta ci promedio de aumento en ci cambio (tejidos afectados I no afectados) de expresiOn de transcriptos de IL.- 17F e IL- 17A, en muesiras de biopsias tisulares pareadas, obtenidas de pacientes que presentaban colitis ulcerosa (CU) J) (12 pares) o enfermedad de Crohn (EC) (M) (16 pares). En ambos juegos de muestras, ambas concentraciones de transcriptos de IL-17A e]L-17F aumentan en los tejidos afectados respecto de los no afectados Ell. Los valores P de pruebas t pareadas son los siguientes: IL-17A (CU), p’0,309; IL- 17A (BC), p0,069; IL-17F (CU), p0,406; IL-17F (BC), p0,206.

100531 La Figura 26 muestra la coloración de citocina intracelular para IL-17F. La coloración para IL- 17F se realizO en cØiulas de ganglio linfÆtico(GL) de ratOn C57BL/6 inmunizado con 100 jig de ovoalbüinina emulsificada en adyuvante coxnpleto de Freund. Las cØlulas se colorearon superficialmente pant CD4, se fijaron, se

- 19-

y se tifieron con un isotipo anti-IgGi decontrol o con anti-IL-17F
murin (don 15-1). Las cifras indican el porcentaje de cØlulas positivas.

DESRIPCION DETALLADA DEL INVENTO

1005] La interleucina- 17F (IL- i7F) es una citocina que pertenece a la familia IL- 17 de prot inas e induce la expresión de citocinas y qpuiniocinas infiamatorias, por ejemplo, IL-, IL-8 GM-CSF, G-CSF, GRO-a, MC1-1, IL-13, TNF-a, TGF-13, etc. La e resión de la IL- 17F se correlaciona con la apaæción de neutrofihia y de diversas en ennedades autoinmunes (Bettelli y Kucbróo, supra). Por ejemplo, la IL-17F se as cia con un aumento on la descomposició n de proteoglicano y tin descenso on la p oducción de proteoglicano por parte del cartilago articular (Hymowitz, supra) a toinmunidad del sistema nervioso central (Langrisl2 supra), respuestas alØrgicas y smÆticas (Kawaguchi, supra) y enfermedades inflamatorias intestinales (Gurney, upra). Por consiguiente, se cree que la sefialización de IL-17F est.Æ relacionada con stornos que incluyen, entre otros, trastorrios infiamatorios, como las enfermedades autoinmunes (por ejemplo, artritis, artritis reumatoidea, psoriasis, lupus eritematoso sistØmico (LES), eselerosis multiple), enfermedades respiratorias (por ejemplo, EPOC, fibrosis quistica, asma, alergia), rechazo detrasplantes (incluso el rechazo del trasplante de órganos sólidos) y enfermedades infainatorias intestinales (por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn).

[0055] Como parte del invento, los inventores confirmaron la participación de la IL- 17F en los trastornos inflamatorios y dØmostraron las siguientes respuestas a la administración de IL-17F: por ejemplo influjo de neutrófilos en el peritoneo (Ejemplo
1. 1), activación de un factor de transcripción primaria de las citocinas inflamatorias, relacionado con un aumento de la secreción de citocinas inllamatorias por parte de los condrocitos primarios (Ejemplo 1.2), aumento de la secreción de citocinas inulamatorias por parte de los fibroblastos pulmonares (Ejemplo 1.3) y concentraciones mayores de Agrecanasa en los condrocitos humanos prirnarios (Ejemplo 7). Los inventores deterrninaron tambiØn que tanto la IL- 17F como. la IL- 17A podrian jugar un papel on la artritis autoinmune (Ejemplo 7), en la psoriasis (Ejemplo 9) y en la enfermedad inflamatoria intestinal (Eli) (Ejemplo 9). Los inventores tambiØn identificaron a la

4fl

- 20--

IL-17R 1 la IL-17RC como receptores la IL-17F (Ejemplo 2), lo cual ofrece asi
blancos uevos para La inhibición del camino de seia1izaci6n de IL-17F. Los inventores
tambi generaron y clasificaron anticuerpos -IL- 17F de acuerdo con la
especi cidad de union, afinidad y capacidad de cadq uno para inhibir La seflalización de 1L- 17F es decir, la bioactividad de la IL- 17F (Ejerriplos 3 y 5). En una realizaciOn, los anticu rpos ayudan a identificar los epitopes de IL- 7F que pueden necesitarse para el recon cimiento de HAM o IL- 17RC, es decir cinco de seis anticuerpos murinos anti-
IL- 17 humana son capaces de interferir en la uni6n de la IL- i 7F con la IL-i 7R, y dos
de lo cinco tambiØn pueden interferir on La uniói de la IL-17F con la IL- 17RC. Los inven ores han demostrado tambiØn la capacidad do algunos de estos anticuerpos para
inhib (es decir, reducir, limitar, bloquear o disminuir de alguna otra forma) las
bioa tividades de La IlL- I 7F, por ejemplo la activación mediada por IL- I 7F de un factor
de tr scripción primario para citocinas iuflamatôrias y, posteriormente, la secreciOn de
cito ma mediada por IL- 17F por parte de los siiioviocitos de tipo flbroblasto primario (Ej plo 4). En este documento tambin se prsentan los polinucleótidos inhibidores que reducen la sefialización de IL- i 7A e IL- 17F, a travØs de la IL- 17R y de La IL-i 7RC (Ej mplo 8). Los inventores demostraron tambin una relación directa entre La IL-21 y la L- 171F, es decir, la capacidad de la H-,-21 para aurneutar la producción de IL -17A y de IL- 17F por parte de las cØlulas T activadas. Por lo tanto, se razona que la inhibición de la sefialización de IL-i 7F tambiØn puede inhibir al menos un efecto asociado con la u ion de la IL-21 con la IL-21R y su activaci4n, por ejemplo, Los mØtodos para inhibir 1 seflalización de IL- 17F pueden ser usados mØtodos de tratamiento de trastornos a ociados con la IL-17F o de trastornos asocjados con la uniOn de la IL-21 con la IL-R y la activaciOn de esta i1tima. Los inventores aislaron tambiOn por primera vez IL-A e EL, 17F de la fuente natural de citocinas. AdemÆs han demostradoy purifIcado un nuevo de IL-17A!IL-17F (por ejemplo, en cØlulas T, y on cØlulas HEK-
y COS, respectivamente) y han demostrado que el heterodimero transduce la (sefializaciOn de IL- 17F, por ejemplo, induciendo la expresiOn de concentraciones de
GRO-c (Ejeinplo 5). Por consiguiente, Los inventores ban proporcionado el
heterodimero como un nuevo blanco para la inhibiciOn del camino de seiialización de

IL- 1 F o para el tratatniento de trastomos inflarnatonos.0 trastomos asociados con Ia uni n de la IL-21 con la IL-21R y Ia activaoiOn de esta tiltitna.

[00 61 Do esta inanera, el presente invento proporciona antagonistas do la sefialización de IL-17F (pot ejemplo, polinucleOtidos inhibidores de IL-17F, IL-17R o IL-17RC; p0 i$ptidos solubles do IL-17R o IL-17RC (incluso fragmentos, por ejemplo fr gmentos de union do IL- 1 7F, o sus proteinas de fusion; anticuerpos inhibidores anti-17F, anti-IL-17R o IL-17kC; o molØcuias antagonistas pequeflas) quo pueden 11 ilizarse para suprimir las respuestas inflamatorias in vivo inediadas pot ff.-17F (con I clusiOn do las mediadas por homodimeros do IL-17F y heterodImeros de
- 17A/IL-17F) y, por consiguiente, que pueden usarse en el diagnóstico, pronOstico, onitoreo o trataniiento de trastomos relacionados con el aumento de la seiializaciOn de
- 17F, es decir, trastomos asociados con IL- 17F o trastomos asociados con la union de la IL-21 con la IL-21R y la activaciOn do esta filtima. La identiflcaciOn y aislaniiento del nuevo heterodimero do IL- 17A/IL- 17F indica que los trastomos relacionados con la seflalizaciOn do IL-17F pueden ser mediados por los homodimeros de IL-17F o los heterodimeros do IL- 17F. Pot consiguiente, el tØrmino "IL- 17F" que se usa en este documento, cuando corrosponda, so reflere a los homodimeros de IL-17F o a los heterodfmeros do IL-17A/IL-17F. Pot ejemplo, el camino do seflalización de IL-17F incluye un camino de seflalizaciOn que puede comprender a cuaiquiera de los dos o a Sambos, homodimeros de U., 17F y heterodlmeros do

[00571 De acuerdo con ella, la solicitud actual proporciona polinucleótidos y polipØptidos relacionados con la seflalizaciOn do IL-17F, incluso polinucleOtidos y polipØptidos do IL- 17R e IL- 17RC. El presente invento tambiØn proporciona anticuerpos, es decir, anticuerpos intactos y sus fragmentos quo so unen al antIgeno, que so combinan con la IL- I 7F, en particular, IL- i7F humana, incluso entre otros, con homodimeros de IL-17F y heterodimeros de IL- 17AJIL-17F. En una realizaciOn, un anticuerpo anti-IL- 17F inhibe o antagoniza al nienos una actividad asociada con la IL-17F (pot ejemplo, bomodImero do U...-17F o heterodImero do IL- 17AIIL-i7F). Pot ejemplo, el anticuerpo anti-IL- 17F puede combinarse con la IL-17F e interferir, por ejemplo, bloqueando una interacciOn entre IL-17F y un complejo receptor do IL-17F;

9S

S

- 22- 22;

por ejemplo, complejos que comprenden la JL-17R o la. IL-17RC. Por consiguiente, los an cuerpos del invento pueden usarse para detectar y, opcionalmente, ixiliibir (es decir, re ucir, limitar, bloquear o disminuir de otra foma), una bioactividad de la IL, 17F; por ej mplo, union entre IL-17F y un complejo receptor de IL-17F o una subunidad del in smo. Por lo tanto, los anticuerpos an6JL-17F del invento pueden usarse para d agnosticar, pronosticar, monitorizar o bien tratar o prevenir trastornos relacionados c n la sefialización de IL-17F o trastornos asociados con la uniOn de la IL-21 con la IL-1R y la activaciOn de esta ültima.

olinucleótidos y polipØptidos de IL- 17F, 1L4 7R e I1-17RC
[0058] El presente invento oftece una dscripeiOn mÆs detallada del camino de sefialización de IL -17F, es decir, la detenni*ación de la IL-17R o de la, IL- 17RC como receptores de la IL- 17F, la aclaraciOn de ls efectos de interferir con la uniOn de la IL-17F con la]L-17R o la IL-17RC usando molØculas inhibidoras, por ejemplo, anticuerpos, protemnas de fusiOn de receptores y ARNsi, y la purificaciOn de heterodimeros de IL- i 7AJ]L- 17F. De esta itanera, ci presente invento se relaciona con poiinucleótidos y polipØptidos de IL-17F, XL- 17R e IL-17RC, incluso polinueleOtidos y polipØptidos inhibidores de IL- 17F, LL-17R e IL-17RC.

[0059] Las secuencias de nucleOtidos y iminoÆcidos de la. I11-17F son conocidas y se proporcionan. La secuencia de nucleOtidOs de la. IL- 17F humana se presenta en la ID DE SEC N° 1. La secuencia de amiuoÆcidos de la proteina U, 17F de extension coinpieta codificada por esa secuencia nucleOtida se presenta en la ID DE SEC N° 2. La secuencia aminoÆcida de IL- 17F mad ra corresponde a una proteina que se inicia aproximadamente on d aminoªcido 31 de la ID DE SEC N° 2 ver, por ejemplo, Solicitud de Patente de EE.UU. No 10/102.080 incorporada en este documento en su totalidad como referencia)

[0060] Las secuencias nucleOtidas y aminoÆcidas de la IL- 17A son conocidas y se proporcionan. La wcuencia nucleOtida de la IL-17A humana se presenta eü la ID DE SEC N° 3, que incluye una tenninaciOn poli(A). La secuencia aniinoÆcidade la protelna IL- i 7A de extensiOn coinpieta correspondiente a esa secuencia nucleOtida se presenta en la ID DE SEC N° 4.

- 23-

[00 11 Las secuencias nucleótidas y aminoÆcidas de la IL- 17R son conocidas y se pr orcionan. La secuencia nucleótida tie la IL-17R hurnana se presenta on la 1D DE S C W 5, que incluye una terminación poIi(A) La secuencia aminoÆcidade la proteina IL 17R de extension completa correspondiente a esa secuencia nucleOtida, se presenta e IaJDDE SEC N°6.

E 0621 Las secuencias nucleótidas y arninoÆôidas de la IL-17RC son conocidas y se roporcionan. Las secuencias nueleOtidas de varios polinucleOtidos de IL-17RC umana, que incluyen terminaciones poli(A) e presentan on la ID DE SEC N° 7, 9, 11, 3 y 15. Las secuencias arninoÆcidas de varias protelnas IL- 17RC humanas de extension completa, correspondientes a esas secuencias nucleOtidas, se presentan on la IDDE SEC N°8, 10, 12, 14y16.

[0063] Los Æcidos nucleicos relacionados on el presente invento pueden comprender ADN o ARN y pueden ser total o parcialmente sintØticos. La referencia a una secuencia nucleOtida como se usa on este documento comprende una molØcuia tie ADN con la secuencia especificada (o un complemento de la misma) e incluye una molØcula de A1.N con la secuencia especifleada, on cual U es sustituido por T a menos que ci contexto requiera otra cosa.

100641 Los polinucleOtidos aislados relacionados con el presente invento pueden usarse como sondas tie hibridaciOn y primarios para identificar y aislar Æcidos nucleicos con secuencias idØnticas o similares a las que codifican los polinucieótidos presentados. Los mØtodos tie hibridación para identiflear y aislar Æcidos nucleicosincluyen: reacción on cadena de polimerasa (PCR), hibridaciOn Southern, hibridaciOn in situ e hibridación Northern que son conocidos por los expertos on el tema.
[0065] Las reacciones de hibridaciOn pueden realizarse baja condiciones tie diferente exigencia. La exigencia de una reacción tie bibridaciOn incluye la difleultad con que se hibridan dos molØculas cualesquiera de Æcido nucleico. Preferentemente, cada polinucleOtido hibridante se hibrida con su polinucleOtido correspondiente baja condiciones tie exigencia reducida, mÆs preferentemente condiciones exigentes y an mÆspreferentemente, condiciones altarnente exigentes. Los ejemplos tie condiciones tie exigencia se presentan on la Tabla I a continuaciOn: condiciones altamente exigentes

-24 -

son

24

aquellas al menos tan exigentes como,

- s on

por ejemplo, las condiciones A a F;

s exigentes son aquellas que son thu exigentes corno, pot ejemplo, las

es G a L; y condiciones de exigencia reducida son aquellas al menos tan con’io, por ejemplo, las condiciones M’ a R.

1. Condiciones de exigencia

C ndiciOn Hlbrfdo Longitud del Temperature de hibridaciOri Temperature de
d polinucleötido hibrido (pb)1 amortlgtador2 lavado
e igencia_________ 1’ amortiguador2
AOftADN

____

>50 65°C; ’{CE 6 65°C; 0,3xC$E
42°C; 1$CSE, 50% de formamida
ADNADN <50 T 1xSE IxCSE
ADN:ARN >50 67°C; 1cCSE6 67°C; 0,3xCSE
45°C; 1xCSE, 50% de formamida
ADN:ARN <50 To*; 1x5E To*; IxCSE
ARN:ARN >50 70°C; I XSE O 70°C; 0,3XCSE
50°C; 1xCS, 50% de formamida
F

___

ARN ARN

_______ <50 T?, 1xCS TF*IXCSE
ADN:ADN >50 65°C; 4xCSE O 65°C; IxCSE
42°C; 4xCSE, 50% de formamida
H ADN:ADN

____

<50 TH*; 4C5E TH*; 4xCSE
AON:ARN >50 67°C; i4xSE O 67°C; IxCSE
4511C;4xCSE, 50% de formamida
J ADN:ARN <50 Tj*;4CSE TJ*;4xCSE
K AN:ARN >50 70°C 4S 67°C; 1xCSE
50% de formamida

I. ARN:ARN <50 ___________t40Q0,,6xC$E, -iS

2xCSE T; 2xC$E
ADN:ADN >50’ 50°C; 2xCSE
50% de

ADN ADN <50 TN*, 6xCSE

AON:ARN >50 550’C. 4xCSE 6 55°C; 2xCSE _________ 420; 6xCSE, 50% de formamida

P ADN:ARN _______ <50 T?*;T6xCSE Tp*; 6xCSE
Q ARN:ARN >50 60°; 4xC8E iS 60°C; 2xC8E
45°c; 6xCSE, 50% de formamida
R

____

ARN:ARN ___________

<50 T; 4xCSE TR*; 4xCSE

1: La longitud del Mbrido as Ia prevista para lafs región/rgiones hibridada/s de los poliiueleótidos bibiidantes. Cuando

un polinucleiStido se bibrida con otro polinueleótido de secucncia desconocida, so supone quo la longitud del hibrido

aura la del polinucleiStido hibridante. Cuando so bibridan"polinucleótidos de secuencia conocida, Ia longitud del hibrido

puede detenninarse alineando las secuencias de ks polinueleótidos a identificando Ia/s regiOrilregiones de

complementariedad iSptima cia secuencia.

2: SSPB (1 xSSPE es NaCl 0,15 M, NaH2PO4 10 mM, yEIY1’A 1,25 mM, pH 7,4) puede sustituirse por CSE (IxCSE as

NaCl 0,15 My citrato de sadie 15 mM) on los amortigcadores do hibridaciiSn y Invade; los lavados so realizan durante

15 minutes desputs do completarse la hibridaciOn. i

15*: La temperatura de hibridación para 1ifbti&s qua so prevó sean cia manes do 50 pares do bases de longitud,

debe ser 5-10°C manor que Is teniperatura de fusion (Tm) del hibrido, claude T,, so determina de acuerdo con las

ecuaciones siguientes. Para hfbridos do menos do 18 pres do bases do longitud, T. (°C) 2(N° debases A + T) + 4(N°

debases G + Q. Para bibridos de 18 a 49 pares de bases do longitud, Tm(°C) 81,5 + 16,6(1og0Na) + 0,41(%G+C)

(600/I), donde N as al n0mero de bases on al hibrido, y Na as Ia conoentraciones de jones de sodio on el amortiguador de hi!ridaci6n (Na para lxCS 0,165 M).
Sc pieden consultar otros ejemplos de condiciones de exigencia para hibridación polinucleôtida on Sambrook, 3., E.F. Fritsh, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratoiy Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Sprig Harbor, NY, capitulos 9 y 11, y Current Protocols in Molecular Biology, 1995, F.M. Ausubel at al.., editores, Joh4 Wiley & Sons, Inc., secciones 2.10 y 6,3-6.4, que se incorporan en este documento corno referenda.

[0 661 Los polinucleótidos aislados relaciomdôs con el presente invento pueden usarse co/no sondas y primarios de hibridaciOn para identificar y aislar el ADN con secuencias q codifiquen variantes alØlicas de los polinucleOtidos divulgados. Las variantes aØlicas son formas alternativas do los poliiiucleótidos presentados que tienen lugar ntturalmente y quo codifican polipØptidos quo son idØnticos o que tienen una similitud cjonsiderable con los polipØptidos codiflca4os por los polinucleó’tidos presentados. referiblemente, las variantes alØlicas tiern al menos an 90% do identidad de ecuencia (mÆspreferiblemente, al menos 9$% do identidad; aün mÆs preferiblemente, 1 menos un 99% do identidad) con los polinucleótidos presentados. Como alternativa, existe una similitud considerable cuando los segmentos de Æcido nucleico so hibridan bajo condiciones do hibridaciOn selectivas (por ejemplo, condiciones altamente exigentes de hibridación) con los polinucleótidos presentados.

100671 Los polinucleótidos aislados relacionados con el presente invento tambiØn pueden ser usados como sondas y primarios do bibridación para identiflcar y aislar ADN con secuencias codificantes de polipØptidos homólogos a los polinucleótidos presentados. Estos hoinologos son polinucleótidos y polipØptidos aislados do una especie diferente a la de los polipØptidos y polinucleótidos presentados, o dentro de la misma especie, porn con una considerable similitud do secuencia con los polinucleótidos y polipØptidos presentados. Preferiblemente, los homólogos polinucleótidos tienen al menos un 50% do identidad do secuencia (mÆs preferiblemente, al menos un 75% de identidad; adn mÆspreferiblemente, al menos un 90% do identidad) con los polinucleótidos divulgados, mientras que los homólogos polipeptidos tienen al menos un 30% de identidad de secuencia (mÆspreferiblemente, al menos un 45% de identidad; aün mÆs preferiblemente, almenos un 60% do identidad)

- 26 -

con los polipØptidos presentados. Preferiblemente, los homólogos do los polinucleótidos y p lipØptidos divulgados son los aislados a partir do especies de mamiferos.

[0 681 Los cÆlculosde "homologia" o do "identidad de secuencia" entre dos secuencias (10 tØrminos se usan on forma intercambiable en este documeuto) so realizan de la si iente manera. Las secuencias so alinean para fines do comparación optima (por ej mplo, pueden introducirse brechas en uno a ambos do una primera o segunda s uencia de aminoÆcidos a de Æcido nucleico para un alineamiento Optimo y las cuencias no homólogas pueden descartarse a los fines do la comparacion). En una r aUzaciOn preferida, la longitud do una secuencia de referenda alineada para o mparaciOn, es at menos do un 30%, preferiblemente at menos un 40%, mÆs referiblemente al menos un 50% y an mÆspreferiblemente, at menos un 60% y hasta thi mÆs preferiblemente, at menos tin 70%, 80%, 90%, 100% de Ia longitud de la ecuencia de referencia. Entonoes so comparan los residuos aminoÆcidos onucleOtidos n las posiciones correspondientes do aniinoÆcidos a de nucleótidos. Cuando una
posiciOn on la primera secuencia estÆ ocupada por el mismo residuo aminoÆcido o
nucleótido que la posieión correspondiente en la segunda secuencia, entonces las
molØculas son idØnticas en esa posiciOn (conio so usa en este documento, la "identidad"
de un aininoÆcido0 Æcido nucleico esequivalente a "homologla" do un aminoÆcido0
Æcido nucleico). La identidad porcentual entre las dos secuencias es thnción do la Scantidad do posiciones idØnticas compartidas par las secuencias, teniendo on cuenta el rnmero do brechas y la longitud do cada breeha quo deben introducirse para lograr un
alineamiento optima de las dos secuencias.

[00691 La oomparaciOn de las secuencias y la determinaciOn del porcentaje do identidad
de secuencias entre dos de ellas, puede lograrse usando un algoritino matemÆtico. En
u-na realizaciOn çreferida, ci porcentaje de identidad entre dos secuencias aminoªcidas
se determina usando el algoritino do Needleman y Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:444-
53) que ha sido incorporado en el programa GAP del paquete do software GCG (disponible on www.gcg.com), usando una matiiz Blossum 62 a una PAM250 y un peso de brecha de 16, 14, 12, 10, 8, 6 0 4 y un peso de longitud do 1, 2, 3, 4, 5 0 6. En otra realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias nucleOtidas se

- 27

nnina usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible on /w.gog.com), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de brecha do 40, 50,

/ 70 u 80 y un peso do longitud de 1, 2, 3, 4, 5 6. Un juego do parÆmelros
icularmente preferido (el que deberia usarse si el usuario no estÆ seguro de los
metros quo debieran aplicarse para determinar si una inolØcula so encuentra dentro
una limitación de identidad u homologla de secuencia del invento) es una matriz de
p taje Blossum 62 eon una penalizaeión de brecha de 12, una penalización extendida
d brecha de 4, y una penalización do brócha de canibio de estructura de 5. El Sprcentaje de identidad entre dos secuencias alminokidas o nucleótidas tambiØn puede tenninarse con el algoritmo do Meyers y Miller ((1989) CABIOS 4:11-17) quo ha sido
I corporado en el programa ALIGN (versiOi 2.0), con una tabla do residuo de peso
AM120, una penalización do longitud de brecha do 12 y una penalización de brecha de

00701 Los polinueleótidos aislados relacionados con el presente invento, tambiØn
pueden usarse como soudas y primarios do hibridación para identificar cØlulas y tejides
quo expresan los polipØptidos relacionados con el presente invento y las condiciones bajo las cuales son expresados.

[0071] AdernÆs, la función de los polipØptidos relacionados con el presente invento puede examinarse directamente usando los polinuoleotidos que codifican a los polipØptidos, para alterar (es decir, aumentar, reducir o modificar) la expresión do los genes correspondientes a los polinucleótidos relacionados con el presente invento on una cØlula u organismo. Estos "genes correspondientes" son las secuencias de ADN gonómico relacionadas con el presente invento, quo se transcriben para producir los ARNm de los cuales se derivan los polinucleótidos relacionados con el presente invento.

[00721 La expresión inodificada de los genes relacionados con el presente invento puede lograrse on una cØlula u organismo mediante el uso do varies polinucleótidos inhibidores, tales como polinucleótidos antisentido, ARNsi y ribozimas que ligan o separan a los ARNin transcritos de los genes relacionados con el invento (ver, per ejemplo, Galderisi et al. (1999) J. Cell Physiol. 181:251-57; Sioud (2001) Curr. Mol.

0

Me4. 1:575-88). Los polinucleótidos inhibidores, de IL-17F, IL-17R o IL-17RC pueden ser /.iti1es como antagonistas do la seflalización 4e IL- 17F y como tales tambiØn pueden serti1es en la prevención o tratamiento de trastornos relacionados con la sefialización de IL- 17F. Los polinucleótidos inhibidores tambión pueden estar compuestos de meros, es decir, pouinucleótidos quo so conjugan y regulan la actividad proteica, por nplo, la actividad de IL-17F, IL-17A, IL-17E. ci IL-17RC. Los aptÆmeros se riben en la literatura; ver, por ejemplo, Nimjee et al. (2005) Annu. Rev. Med. 555-83 y Patel (1997) Curr, Opin. Chem. Biol. 1:32-46.
73] Los polinucleótidos antisentido ci ribozimas relacionados eon el invento pueden complementarios a toda una cadena codificante do un gen relacionado con el invento a solo una porciOn del mismo. Como
pueden ser complementarios a
de un gen relacionado con el
ribozimas pueden sintetizarse
enzimÆtico pormedic de procediinientos

los pouinucleOtidos antisentido o
reg-ión no codificante do la cadena
ci. Los pouinucleOtidos antisentido o
ci mediante reacciones de ligado
)S por los expertos en esta tecnologia.
Las uniones nucleósidas de polinucle6tidos sintetizados quimicamente pueden modificarse para aumentar su capacidad para resistir la degradaciOn mediada por nucleasa, asi como para aumentar su especificidad do secuencia. Estas modificaciones de las uniones incluyen, entre otras, uniones do fosforotioato, metilfosfonato, fosforoamidato, boranofosfato, morfolinoy âcido nucleico pØptido (ANP) (Galderisi et al., supra; Heasman (2002) Dev. Biol. 243:209-14; Micldefield (2001) Curr. Med. Chem. 8:1157-79). Alternativamente, estas molØculas pueden producirse biológicamente al utilizar un vector de àxpresiOn dentro del cual so ha subclonado un polinucleótido relacionado eon el presente invento, en una orientación antisentido (es decir, inversa).
100741 Los polinucleótidos inhibidores del presente invento incluyen tambiØn oligonucleótidos fonnadores do triple hØlice (OFT) quo se unen en el surco mayor del ADN doble hØlice con gran especificidad y afinidad (Knauert y Glazer (2001) Hum. Mol. Genet. 10:2243-51). La expresión de los genes relacionados con el presente invento puede ser inhibida al dirigir OFT complementarios a las regiones reguladoras do

0

- 29-

los nes (es decir, las secuencias promotoras o realzantes) para forinar estructuras de tripl hØlice con ci fin de impedir la transcripción de los genes.

100 51 En una realización del invento, los polinucleótidos inbibidores del presente to son molØculas cortas de ARN de intetferencia (ARNsi). Estas molØculas de ANsi son molØculas cortas (preferentemente e 19 a 25 nucleótidos, o mejor 4n, de 19 21 nucleótidos) de ARN de cadena doble, que causan una degrathción especifica la secuencia del ARNm blanco. Esta degradacion se conoce como interferencia de IN(ARM) (ver, por ejemplo, Bass (2001) Nature 411:428-29). Originalmente ntificado on organismos inferiores, el ARN ha sido aplicado eficazmente en cØlulas mamifero y recientemente demostró evitar la hepatitis fulminante en ratones tratados i molØculas de ARNi dirigidas al ARNm Fas (Song et al. (2003) Nature Med. 9:347-). AdemÆs,se ha informado que ci ARNsi,/ administrado intratecalmente, bloquea las puestas de dolor en dos modelos (modelo de dolor inducido por agonistas y modelo dolor neuropÆtico)en rata (Dorn et al. (2004) Nucleic Acids Res. 32(5):e49).

00761 Las molØculas de ARNsi del presente invento pueden ser generadas por de dos molØculas compiementarias de ARN de cadena simple (una de las
cuales concuerda con una pardon del ARNm blanco) (Fire et al., Patente de EE.UU N° 6.506.559) o mediante ci usa de una sola molØcula en farina de horquilla de ARN que se pliega sabre si misma para producir la porción de cadena doble necesaria (Yu et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6047-52). Las molØculas de ARNsi pueden sintetizarse quumicamente (Elbasbir et al. 2001) Nature 411:494-98) a producirse par transcripciOn in vitro usando plantillas dc, ADN de una sola cadena (Yu et al., supra). Como alternativa, las molØculas de ARNSi pueden producirse biológicamente, sea en forma temporal (Yu et al., supra; Sui et al. (2002) Proc. Nail. Acad. Sci. USA 99:5515-
20) a permanente (Paddison et al. (2002) Proc. Nail. Acad. Sci. USA 99:1443-48), usando vectores de expresiOn que contengan las secuencias de sentido y antisentido de ARNsi. Recientemente se demostrO la disminuciOn de concentraciones del ARNm

blanco on cØlulas humanas primarias en una forma eficiente y especIfica para secuencia, usando vectores adenovirales que expresan ARN en horquilla que luego se convierten en ARNsi (Arts et al. (2003) Genome Res. 13:2325-32).

0

- 30-

E0071 Las molØculas do ARNsi orientadas a los polinucleótidos relacionados con el preente invento pueden designarse de acuerdo i con criterios conocidos (ver, Elbashir et al. (2001) EMBO J. 20:6877-88). Por ejemplo el seginento blanco del ARNm blanco de e comenzar preferentemente con AA (mÆspreferido), TA, GA o CA; la proporción G de la molØcula ARNsi debe ser del 45 a! 55%; preferentemente, la molØcuia ARNsi n debe contener lies nucleótidos iguales seguidos; preferentemente, la niolØcula de Si no debe contener siete 0/C mezciados seguidos y ci segmento blanco debe estar
p eferentemente en la region ORF del ARNm blanco y debe tenet al menos 75 pb d spus de la ATG de inicio y al menos 75 pb antes del codón do parada Segin estos c iterios, o en otros criterios conocidos (pot’ ejemplo, Reynolds et al. (2004) Nature iotechnol. 22:326-30), la sintesis de las moIcuIas do ARNsi del presente invento quo o ocupen de los polinucleOtidos de A1Nm r1acionados con ci presente invento puede or realizada por una persona no experta en area. Los ejemplos preferidos de ARNsi ara usar en los mØtodos presentados so establecen en las ID DE SEC N’ 17-32 y rresponden a ARNsi ütiles para actuar obre IL-17R (ID DE SEC N° 17-24) e 17RC (ID DE SEC N° 25-32).

100781 La expresión modificada de los
organismo tambiØn puede lograrse medi
huinanos, en los cuales se han introducido

relacionados con el presente invento en un
la creaciOn do animales transgØnicos no
de genomas relacionados con
el presente invento. Tales animales trausgØnicos incluyen los quo tienen m1tip1es copias de un gen (es decir, ci transgØn) del presente invento. Las secuencias reguladoras especIficas de los tejidos pueden unirse operativamente al trausgØn para dirigir la expresiOn do un polipØptido relacionado con ci presente invento hacia cØlulas particulares o hacia una etapa de desarro10 en particular. Los mØtodos para generar animales transgØnicos mediante manipulación del embriOn y microinyecciOn, particu!armente animales como ratones, se ban vuelto convencionales y son conocidos (pot ejemplo, Bockamp et al., Physiol. Genomics 11:115-32 (2002)).

[0079] La expresiOn modificada de los genes relacionados con el presente invento en un organismo tambiØn puede lograrse a travØs do la creación do animales cuyos genes endógenos quo correspondan a los polinucleótidos relacionados con ci presente invento

FL!

- 31-

L sido alterados mediante la inserciOn de secuencias polinucleótidas extraæas (es un animal con genes inactivos). La regióncodificante del gem endOgeno puede set generando asi una proteina no funcional. Como altemativa, la region
hacia arriba cl gem endOgeno puede ser trastomada o reemplazada con elementos reguladors, dando lugar a la expresión alterada de la proteina thncional. Los inØtodos para generar amimales con genes inactivados incluyen la homóloga y son conocidos (por ejemplo, Wolfer et al., Trends Neurosci.
2:336-40 (2002)).

080] Los polinucleOtidos aislados del presente invento tambiØn pueden set unidos o erativamente a una secuencia de control de pxpresi6n o ligados dentro de un vector de e presiOn para producciOn recombinante qe los polipØptidos (incluso fragmentos ctivos o sus polipØptidos de fusion) relaciondos con ci presente invento. Los mØtodos enerales de expresiOn de proteinas recombinntes son conocidos.
00811 Como se usa en este documento, un vector de expresiOn intenta referirse a una olØcula de Æcidonucleico capaz de transportar otto Æcidonucleico al cual se ha unido. n tipo de vector es un plÆsmido, que se refiere a un bucle circular de ADN decadena doble, al cual se pueden ligar segmentos de AN adicionales. Otto tipo de vector es un vector viral on ci que se pueden ligar segmentos adicionales de ADN a un genoma viral. Algunos vectores son capaces de replicars,e autOnomamente en una cØlula anfitriona dentro de la cual se introducen (por ejempb, vectores bacterianos que cuentan eon un origen bacteriano de replicaciOn y vectores de mamIfero episOmicos). Otros vectores (por ejemplo, los vectores no episOmicos de mamifero) pueden integrarse dentro del genoma de una cØlula anfitriona al ocurrir la introducción on la cØlula anfitriona y pot consiguiente ser repiicados conjuntamente con ci genoma del anfltriOn. AdemÆs, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresiOn de los genes con los que Sc unen operativamente. Tales vectores se conocen en esle documento como vectores de expresiOn recombinante (o simplemente, vectores de expresiOn). En general, los vectores de expresiOn, que son Utiles en las tØcnicas recombinantes de ADN, se encuentran a menudo en forma de plÆsmidos.En la presente especificación, plÆsmido y vector pueden usarse en forma intercambiable ya que ci plÆsmido es la forma de vector

- 32-

usaa con mayor frecuencia. Sin embargo, el invento intenta incluir otras formas de vecores de expresiOn, tales como los veetores sira1es (per ejemplo, itrovirus carentes

de / replicación, adenovirus y virus adenoasociados) que cumplen funciones
eqi.ivalentes.

[0821 En una realización, los polinucleótidos relacionados con el presente invento se us ii para crear agonistas de IL-17F recombinantes, per ejemplo, los que pueden ntificarse de acuerdo a la preseucia de al menos un "motivo de union con el receptor IL-17F". Como se usa en este documento, el tØrmino "motivo de union con el eptor de IL-1717" incluye secuencias aminoÆcidas o residues que son importantes ra la union de la IL- i 7F con su receptor necsario. Entre los ejemplos de agonistas de 17F Se pueden enumerar: homodimero de 11L,17F, heterodImero de IL-i7A/IL- 1 7F, agmentos de los mismos, por ejemplo, fragnentos de uniOn de IL-17R o 1L-T7RC o olØculas pequeflas (descritas mÆs abajo).Tales agonistas pueden ser t’itiles para regular hematopoyesis y per consiguiente para el tratamiento de deficiencias de cØlulas ieloides o linfoides. En otra realizaciOn, los polinucleOtidos relacionados con el esente invento se usan para crear antaonistas de sefializaciOn de IL-17F (por emplo, polinucleótidos inhibidores de IL-17F, IL-17R o IL- T7RC; polipØptidos solubles de IL- 17R o IL-T7RC (incluso
de IL- 17F o sus proteinas de fusiOn; ant
1L-17RC, que pueden inhibir la bioacl
heterodImeros de IL- 17A/IL- 17F 0 de 111

per ejemplo, fragmentos de uniOn
inhibidores anti-IL-17F, anti-IL-17R o
de los homodImeros de IL-17F de los
antagonistas pequefias, etc.).

[00831 Los mØtodos para crear polipØptidos de fusiOn, es decir una primera porciOn polipeptidica unida a una segunda porciOü polipeptidica, son conocidos. Por ejemplo, un polipØptido de IL- i 7F o un polipØptido receptor de IL- i 7F (por ejemplo, IL-i 7R o IL- 17RC y sus fragmentos) puede unirse a una segunda porción polipeptidica, por ejemplo, una imnunoglobulina o un fragr!iento de la misma (tal come su fragmento de union de Fc). En algunas realizaciones, la primera porción polipeptidica incluye, por ejemplo, polipØptido de IL- i 7RC de longitud completa. Como alternativa, el primer polipØptido puede comprender menos que la cadena compieta de polipOptido de IL-17RC. AdemÆs, las fonnas solubles de, por ejemplo, IL-17RC, pueden fundirse a

100

- 33- 3 -

de secuencias "de uniOn a la porciOn Ec de una inmunoglobulina. TambiØn usarse otras proteinas de fusiOn, tales: como las que presentan glutatiOn-S-
i-asa (GST), Lex-A, tiorredoxina (TRX) o proteina de uniOn a maltosa (MBP).

La segunda porciOn polipeptidica es preferentemente soluble. En algunas
Ia segunda porciOn polipeptidica prolonga la semivida (por ejemplo, la
sØrica) del polipeptido ligado. En algunas realizaciones, la segunda porción
inciuye una secuencia que facilita la asociación del polipØptido de fusiOn
con un segundo polipØptido de IL- i 7F o IL- i7R En realizaciones preferidas, el s gundo polipØptido incluye al menos una region de tin polipØptido inmunogiobuuInico. L s polipØptidos de fbsiOn de inmunoglobuuinas son conocidos y se describen on las P tentes de EE.UU. Niimeros 5.516.964; 5.225.538; 5.428.130; 5.514.582; 5.714.147 y .455.165, las cuales se incorporan on este dpcumento como referencia. Las protelnas o fusiOn pueden incluir ademÆs una secuencia de union quo una la primera porciOn
olipeptidica, pot ejemplo IL-17F o IL-17R y sus fragmentos, a la segunda porciOn. El
so de estas secuencias de uniOn es conocido. Por ejemplo, la proteina de fusiOn puede
ncluir un pØptido do uniOn, por ejemplo, unb de entre 2 y 20 axninoÆcidosdo longitud, preferentemente de menos do 10 aminoÆidos de longitud. En una realizaciOn, ci
pØptido do union puede tenet una longitud de 2 aminoÆcidos.

. [0085] En otra realizaciOn, la proteina recmbinante inoluye una secuencia de seftal heterOloga (es decir, una secuencia polipeptIdica que no estÆpresente en tin polipØptido
codifloado por un Æcido nucleico do U- 17P, IL- i 7R o IL- 17RC) en su extremo N. Pot
ejemplo, una secuencia de sefial de otra proteina puede unirse con un polipØptido de
IL-17R o IL-i7RC y sus fragmentos o::SUS protefnas de fusiOn. En ciertas cØlulas
anfitrionas (por ejemplo, cØlulas anfitrionas do mamifero), la expresiOn o secreciOn do
protelnas recombinantes puede awnentarse mediante ci uso do una secuencia do seflal heterOloga. Un pØptido de sefial que puede incluirse en la proteina do fusion es ci pØptido de seæal melitina MKFLVNVALVFMVVYISYIYA (ID DE SEC NO 33).

[0086] Una proteina do fusiOn del invento puede producirse usando tØcnicas estÆndardo ADN recombinante. Pot ejemplo, la codificaciOn do fragmentos de ADN para las diferentes secuencias polipeptidicas se unen entre si on la estruetura do acuerdo con

el

34 -

a5 convencionales, empleando, pot ejemplo, terminales romas o escalonadas para ado, digestion con enzima de restricción paia lograr las terminaciones apropiadas,
lo de los extremos cohesivos segin correspdnda, tratamiento con fosfatasa alcalina evitar la uniOn no deseada y el ligado enzitnAtico. En otra realizaciOn, el gen de
ti puede ser sintetizado pot tØcnicas convencionales, entre elias sintetizadores de automÆticos. Como aiternativa, puede recurrirse a la amplificación por PCR de fra4mentos de genes, usando pnmarios de anclaje quo produzcan salientes

:o

plementarias entre dos fragmentos consecutivos de gen que pueden posteriormente ser combinados y reamplifleados para generar una secuencia de gen quimØrico (vet, pot ej plo, Ausubel et al. (Red.) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & S s, 1992). AdemÆs, muchos vectores de ecpresi6n que codiflcan una porción do fu iOn (por ejemplo, en la regiOn Fe de u$ cadena inmunogiobulinica pesada) so e cuentran disponibles comercialmente. Se puede clonar un Æcido nucleico quo c difique una 1L-17F, IL-17R o IL-17RC en dicho vector de expresiOn de tal modo que 1 porción de fusion est6 ligada dentro de la etructura a la proteina inmunoglobuilnica. n algunas realizaciones, los polipØptidos de fusiOn do IL, i 7F, IL- i7R o IL- i 7RC isten como oligóineràs, tales como dimeroso trimeros.

00871 Los vectores de expresiOn recombinantes del invento pueden ller secuencias dicionales, tales como secuencias que regulen la aplicaciOn del vector en las cØlulas fitrionas (por ejemplo, los or!genes 4e la replicaciOn) y genes marcadores eleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las cØlulas anfitrionas en las cuales se ha introducido el vector. Pot ejemplo, por Ia general ci gen marcador seleccionable conflere resistencia a drogas tales coma 0418, higromicina o metotrexato en cØlula anfitriona en la cual so lo ha introducido. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen ci gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) para usar en cØlulas anfitrionas dhfr- con selecciOnhtmplifloaciOn de nietotrexato) y ci gen (para selección do 0418).

[00881 Sc pueden escoger o construir vectores adecuados quo contengan las secuencias reguladoras apropiadas, inciuso secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias do poliadenilación, secuencias reaizantes, genes marcadores y otras

-.35-

see encias, por ejemplo, algunas que regulen la replieación del vector en las cØlulas anf ionas (pot ejemplo, origenes de la replicación) segi.’rn corresponda. Los vectores
Pu en set plÆsmidos o virales, por ejemplo, lagos o fagØmidos, segün corresponda.
Pa obtener mÆs detalles, consultar pot ejezuplo Molecular Cloning: a Laboratory
M ual: 2 ed., Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Muchas
tØc iicas y protocolos conocidos para la manipuiación de Æcido nucleico, por ejemplo, on la preparación de constructos de Æcido nucleico, mutagØnesis, secuenciación, in oducción de ADN en las cØlulas y expresión del gen, asi come de anÆlisis de pr telnas, se describen detalladamente en Current Protocols in Molecular Biology, T e., Ausubel et al. red., John Wiley & Sons, 192.

E 0891 Por consiguiente, un aspecto mÆs del presente invento proporciona una cØlula a fitriona que consiste de tin Æcidonucleico cpmo se presenta en este documento. Otro a pecto es que se ofrece tin mØtodo que coTtsiste on introducir dicho Æcido nucleico ntro de una cØlula anfitriona. La introdi.cción puede emplear cualquier tØcnica isponible. Para las cØlulas eucariotas, las tØcnicas adecuadas pueden incluir de fosfato de ealcio, DEAE-DextrÆn,electroporación, transfección niediada
liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus, pot ejemplo, el virus de ma o, para cØlulas de inseetos, el baculovirus. Para cØlulas bacterianas, las tØcnicas pueden incluir transformación de cloruro de calcio, electroporación y
usando tin bacteriófago. La introduccidn puede hacerse causando o
la expresión a partir del Æcidonucleico, per ejemplo, per cultivo de cØlulas anfitrionas bajo condiciones para la expresiózi del gen.

[0090] Numerosas lineas celulares pueden funcionar come cØlulas anfitrionas adecuadas para expresión recombinante de lbs polipØptidos relacionados con el presente invento. Las lineas de cØlulas de mamiferO anfitrionas incluyen, pot ejemplo, cØlulas COS, CHO, 293, A431, 3T3, CV-1, HeLa, L, BHK21, HL-60, U937, HaK, Jurkat, asI como cepas celulares derivadas de cultivos in vitro de tejidos y explantes primaries.

[0091] Come alternativa podrIa ser posible producir recombinantemente los polipØptidos relacionados con ci presente invento on eucariotas menores, tales corno levaduras, o en procariotas. Las cepas de Jevaduras potencialmente adecuadas incluyen.

- 36-

Sacciaromyces cerevisiae, Schizosaccharomycek pombe, cepas de Kluyveromyces y cep s de Candida. Las cepas bacterianas potencialmente adecuadas incluyen
Esc erichia coli, Bacillus subtilis y Salmonella typhimurium. Si los polipØptidos
rel ionados con el presente invento se produceti en levaduras o bacterias, tal vez sea
nec sario modificarlos, pot ejemplo por fosfórilación o glicosilaciOn de los sitios
apr piados, para obtener la función necesaria. Dichas uniones covalentes pueden
to e usando rnØtodos quimicos o enzimÆticosconocidos.

S100 J La expresión on bacterias puede causar Ia formación de cuerpos de inclusion que
inc rporen la proteina recombinante. Pot ende, puede ser necesario recurrir al replegado
de proteina recombinante para producir material activo o mÆs activo. Se conocen
va ios mØtodos para obtener proteinas heter6l4gas correctamente plegadas a partir de
on rpos bacterianos de inclusion. Estos mØtods generalmente implican solubilizar la
p teina a partir de los cuerpos de inclusiOn, paa despuØs desnaturalizar completamente
la proteina usando un agente caotrópico. Cundo existen residuos cisteinicos en la se uencia aminoÆciclaprimaria de la proteina, ’frecuentemente es necesarlo proceder al r lique on un ambiente quo pennita la fbrmación correcta de uniones disulfuro (un si tema redox). Los mØtodos generales para el repliegue son presentados en Kohno (1990) Meth. Enzymol. 185:187-95. EP 043225 y la Patente de EE.UTJ. 5.399.677 d scribe otros mØtodos apropiados.

[t0931 Los polipØptidos relacionados con ci Ipresente invento pueden ser producidos

L’aculovirus/SD

inanteniente al unir operativamente los polinucleOtidos aislados del presente
a secuencias testigos adecuadas, uno o mÆs vectores de expresión de
s, tales como los vectores de baulovitus, y al usar un sistema de expresión de
de insectos. Los materiales y mØtodos para sistemas de expresión para
estÆn disponibies comercialinente en fomia de kits @or ejemplo, kit
ACfi, Invitrogen, Carlsbad, CA).

I DespuØs de la expresiOn recombinante en las cØlulas anfittionas apropiadas, los lipØptidos recombinantes del presente invento pueden entonces set purificados desde medio de oultivo o los extractos celulares por medio de procesos de purificaciOn come inmunoprecipitaciOn, filtraciOn con gel y cromatografla de

[i

a1intere bio iónico. Pot ejemplo, las formas solubles de antagonistas de seflalización de IL-17F coma protelnas de EL-17R a proteinas de [L-17RC (incluso sus fragmentos o sus p teinas de fusion); a los agonistas de la IL-17F, como la LL-17F soluble (en forma de homodImero o heterodmero de ll... 1 7A/IL- 1 7F) pueden purificarse a partir e medios condicionados. Las formas 1igads a membrana de un antagonista de sefali aciOn de IL-17F pueden purificarse preparaiLdo una fracciOn de membrana total a partir de la cØlula expresante y extrayendo las mebranas con un detergente no iOnico, como Triton X-100. Un polipØptido relacionado con ci presente invento puede cone ntraise usando un filtro de concentración prteica disponible comercialmente, pot ejem lo, una unidad AMICONfi o Millipore PELJCONfi de ultraflltración (Millipore, l3ille ica, MA). DespuØs del paso de concentrac"On, ci coneentrado puede pasarse par una atriz de purificaciOn, tal como un media le filtración de gel. Como alternativa, pue4e emplearse una resina de intercambio anioiico, por ejemplo, una matriz a sustrato que/ contenga grupos dietilaminoetil (DEAE) polietilenimina (PEI) colgantes. Las pueden ser de acrilaniina, agarosa,
en la purificación de protelnas.
de intercambio de cationes. Los i
matrices insolubles quo comprenden
los grupos sulfopropilo (coma
St. Louis, MO). La purificación
ial sobrenadante de cultivos tambión resinas de afinidad como la

celulosa u otros tipos empleados altemativa, se puede emplear un
s de cationes adecuados incluyen
sulfopropilo o carboximetilo. Se
de S-SEPHAROSE(V, Sigma-
proteinas recombinantes a partir del
incluir uno a mÆs pasos en columnas
A-agarosa, la heparina-
T)YOPEARLfi (Toyo Soda Manufacturing Co.,Ltd., JapOn) o ci Azul de Cibacrorno 33A SEPHAROSEfi (Tosoh biosciences, Sati Francisco, CA), o par cromatografla de hidrófoba usando resinas tales como Øter fenfhico, Øter butilico o Øter
a par cromatografla de inniunoafinidad. Finalmente, se pueden emplear uno a
pasos par cromatografla de hiquidos de alto rendimiento, fase inversa (HPLC -Fl) medios hidrOfobos de }IPLC-FI, coma gel de silice eon grupos metihicos u alifÆticos colgantes,para purificar mÆs la proteinarecombinante. Las columnas de que incluyen anticuerpos (por ejemplo, los descritos usando los mØtodos aqui) para la protelna recombinante tambiØn pueden usarse en la puriflcaciOn

a pa
relac
o los
IL-11
un Dl

a

de

- 38-

con los mØtodos conocidos. Algunos o todos los pasos de purIficación
on varias combinaciones o con otros nØtodos conocidos, tambiØn pueden para proporcionar una proteina recmbinante aislada sustancialmente Preferentemente, la proteina recombinaite aislada se purifica de modo que unente no contenga otras protenas mann’feras. Ademas, estos procesos de Lcjófl tambiØn pueden usarse para purificar Jos polipØptidos del presente invento de otras fuentes, incluso flientes natuiiiles. Pot ejemplo, los polipØptidos iados eon el invento, como los agonistas de! IL- 17F (por ejemplo IL-i 7F soluble) itagonistas de seflalización de IL- i7F (como proteinas solubles de IL- i 7R o de C, incluso sus fragmentos o sus proteinas de fusion) que son expresados como [ucto de animales transgØnicos, por ejempl, como un componente de la leche de cabras, cerdas u ovejas transgØnicas, pieden purificarse como se describiO inente.

Alternativamente, los polipØptidos ttambiØn pueden set expresados inantemente en una forma que facilit,e la puriflcaciOn. Por ejemplo, los tidos pueden expresarse como fusiones en proteinas, como la proteina de uniOn sa, glutatión-S-transferasa o tiorredoxina. Los kits para expresiOn y puriflcación proteinas de fusion son
Pharmacia (Piscataway, NJ), e
tambiØn pueden ser mareadas
o purificadas usando un

pot New England BioLabs (Beverly,
respectivamente. Las proteinas
un epitope pequeflo y posteriormente
especiflco para el epitope. Un epitope
es el FLAG, comercializado por Eastman Kodak (New Haven, CT).

Alternativamente, las proteinas de fusion recombinantes de IL- 17F e IL- i 7A
ser marcadas con diferentes epitopes para permitir la purificación de
de IL- hA/IL- 17F. La existencia de marcas diferentes on IL-17F e IL-
17A permite aislar los heterodimeros de IL- i7AIIL- 17F que prÆeticamenteno tienen de IL-17A e IL-17F. Por ejemplo, la IL, 17A puede ser marcada con un
como el FLAG o el myc, mientras que la IL-17F se marca al mismo tiempo con epitope como His o GST y ambas proteinas pueden expresarse simultÆneamenteon cØlula. Los extractos de la cØlula anfitriona recombinante o los medios en que se

el

- 39 *

itiva las cØlulas anfitrionas, serian obterndos y sometidos a una purifIcación par matgrafia do afinidad de dos pasos, bajo condiciones no reductoras. La primera luniia do afmidad so conjugaria con una do las dos marcas diferentes, par ejemplo, Un Itop FLAG ftindido a la IL- 17A (o a un fragmento do la IL- 17A) y por consiguiente lavdo do la primera columna contendria (predominantemente) homodimeros do IL-17F y el eluyente de Ia primera columna contendria tanto heterodimeros do IL- 17A/IL-
17F ama homodImeros do IL- 17A. El eiuyente de la primera columna se colocaria
onto ces sobre una segunda columna do afinidad quo so conjugara especificamente con la o do las dos marcas diferentes, par ejemplo, una marca His fundida a IL-17F. Por cons guiente, el lavado de la segunda columna co’ntendria homodimeros de IL- 17A y el eluy nte do la segunda columna contendria predonilnante o exciusivamente, hete odimeros de IL- i 7A/IL- 17F (es decir, prÆcticamentesin homodimeros do IL- 17A
y 17F). Los extractos obtenidos de las cØivas anfitrionas recombinantes a de los
me os de las cØlulas anfitrionas so podrian obtner baja condiciones no reductoras de
ma a tal que las interacciones de una proteina a otra no se interrumpieran, a podrian
obt erse baja condiciones reductoras, para luego tratarlas do modo de pennitir el
re iegue y las interacciones apropiadas do los monórneros do IL- i 7F e IL- 17A
co tenidos en ellos. Una persona experta en esta teenologia comprende fÆcilmente quo
u cØlula anfitriona no necesita expresar am6as proteinas do fusion do IL- 17F e IL-
1 A; mÆs bien los extractos do cØlulas o de triedios do transfectantes individuales, por ej mplo, una cØlula anfitriona que expresa una proteina de fusion de IL- 17A a IL- 17F, p dna obtenerse y combinarse baja condicions quo permitiesen quo los monómeros de
- 17A e IL- 17F se dimenizaran.

971 Los polipØptidos relacionados eon el presente invento, incluso los antagonistas seflalizaciOn de M,1 7F, tambiØn pueden producirse mediante una sintesis quimica Lvencional conocida. Los mØtodos para sintetizar quimicamente tales polipØptidos conocidos par los expertos en esta tecuologia. Dichos polipØptidos quimicamente ;Øticos pueden poseer propiedades biolOgicas en comün con los polipØptidos irales purifleados y par consiguiene pueden emplearse coma sustitutos activos a imnunolOgicos para los polipØptidos naturales.

-40-

[009 1 Los inventores tambiØn pudieron aislar/ la forma "natural", es decir la no reconbinante, de los polipØptidos del invento, incluso una forma natural de la M, 17A (ver/ el Ejemplo 5). Por consiguiente, los polipØptidos del presente invento incluyen hor4odimero natural de IL-17A, homodimero natural de IL-17F, heterodImero natural de IJL-17A/1L-17F, etc.

’00 9’

Los polipØptidos relacionados con ci prŁsenteinvento, incluso los antagonistas
de /seæaiizacion de IL-17F, tambiØn compinden molØculas que son estructurahnente

01

difrentes de los polipØptidos presentados (por ejemplo, que tienen una secuencia Ic emente modificada) pero que tienen pÆcticainente las mismas propiedades bi qulmicas que los polipØptidos presentados es decir, solo han cambiado en cuanto a lo residuos aminoÆcidosfttncionalmente no sencia1es). Tales molØculas incluyen las v riantes alØlicas que se producen naturalmente y las variantes deliberadarnente odificadas que contienen alteraciones, sustituciones, reemplazs, inserciones o iminaciones. Las tØcnicas para dichas inodificaciones, sustituciones, reemplazos, i serciones o eliniinaciones son bien conocidas por los expertos en esta tecuologla. En igunas realizaciones, la porciOn polipeptidica es proporcionada corm un polipØptido ariante que contiene mutaciones on la secuencia natural (tipo silvestre) que dan lugar a na secuencia mÆs resistente a la proteólisis (en comparaciOn eon la secuencia no mutada).

[001001 Los polipØptidos de IL- 17F (incluso los homodiineros de IL-17F y los heterodimeros de IL- 17AIIL-17F), de IL-7R y de IL-17RC, sus fragmentos o sus polipØptidos de thsiOn, sus formas recombinantes y naturales, o la IL-17A natural, pueden usarse para seleccionar agentes (por ejemplo, otros antagonistas de seflalizaeiOn de)L-17F, por ejemplo anticuerpos anti-IL-17F) que son capaces de conjugar IL-17F a de inhibir la bioaetividad de la IL- i 7F. Las pruebas de uniOn que utilizan una protelna de uniOn deseada, imnovilizada a no, son bien conocidas y pueden usarse para este fin con los polipØptidos relacionados con ci presente invento, incluso los antagonistas de seflalizaciOn de IL-i 7F del invento, par ejemplo, la IL- 17R a la IL- 17RC. Las pruebas de selecciOn basadas on cØlulas purificadas o en proteinas (sin cØlulas) pueden usarse para identiflcar tales agentes. Par ejemplo, la proteina de IL- 17F puede ser imnovilizadà

en

-41-

fo a purificada on un portador y se puede medir la conjugación de ligandos on iales con la IL- i 7F purificada

Lic erpos

[001 11 En otras realizaciones, el mvnto proporciona antagonistas 1e sefta4zacion de IL- 17F come anticuerpos, e decir, anticuerpos intactos y sus fragrientos de union a antigenos, que se conjugal especificamente con IL- 17F (incluso los lTomodimeros de IL- i 7F o heterodImeros de,:: IL- 17A/IL- 1 7F), preferiblemente IL-17F /de mamifero (por ejemplo, huniana), o a lo$ receptores pam IL- 17F, pot ejemplo, IL-1/7R o TL-17RC. En una realizaciOn, los anticuerpos son del tipo inhibidor, es decir, inhi on al menos una bioactividad de la IL-17F Tor ejemplo, la union de la IL-17F y su rec ptor, la activación mediada por IL- i 7F de los componentes de seflalización; pot eje plo, NF-?B, la inducciOn de la producciªn de citocina mediada per IL-17F, el a ento en Agrecanasa mediado por IL- 17F, et) y pueden ser iitiles en el diagnóstico, el pronóstico, el monitoreo o el tratamieno de trastornos relacionados con la se alizaciOn de IL- I 7F. La regulaciOn positiva de la producciOn de IL- i7A e IL- i 7F per pa e de la IL-21 (vet el Ejemplo 5) sugiere que los efectos proinflamatorios asociados co la uniOn de la IL-21 con la IL-21R y la ativación de esta ültima (por ejemplo, la Se alizaciOn de I1,21) son mediadas por homodimeros de M, 17A, homodimeros de IL-1 F o heterodimeros de IL-17A/IL-17F. Per consiguiente, los anticuerpos del invento q e niitigan la sefializaciOn de IL-17F tambiØn pueden set anticuerpos inhibidores para a menos una actividad asociada con la seflalizaciOn de IL-21 (por ejemplo, la odulación de la producciOn de citocina, inflamación en trastornos i flaniatorios/autoinmunes tales como trastornos o enfermedades inflamatorias i testinales (Ells), artritis reumatoidea, recbzo de trasplante/injerto y psoriasis), etc; er Solicitud de Patente de EE.UU. N° 60/59.086 y 60/39176) y pueden set itiIes am diagnosticar, pronosticar, monitorizar o tratar trastornos asociados con la efializaciOn de IL-2 1.

021 AdemÆs, el invento proporciona anticuerpos antilL-17F, que se unen elficamente a IL-17F pero que no inhiben su seæalizaciOn (es decir, anticuerpos de ción). Tales anticuerpos pueden usarse pam detectar la presencia de protelna de IL-

17F

el

EPA

or ejemplo, como un ltmodImero a heteródimero) coma parte de un kit para sticar, pronosticar a monitorizar trastornos relacionados con la seæalización de
En una realización, el anticuerpo estÆdii-igIdo a la IL- i 7F. En otra realización,
uerpo es de tipo monoclonal o de especificidad individual. Los anticuerpos tambØn pueden ser humanos, humanizados, quimricos a generados in vitro contra IL-

17F umana.

[001 31 Una persona experta en esta tecnologia reconocerÆ que,como se usa en este ocumento, el tØrniino "anticuerpo" se refiere a una proteina que comprende al men s una, y preferentemente dos, regiones varibles de cadena pesada (H), (abreviado aqul como VII), y al menos una y preferentemnte dos regiones variables de cadena livi a (L) (abreviado aquI coma VL). Las regiones VII y VL pueden subdividirse ade en regiones de hipervariabilidad, denOminadas, "regiones determinantes de
co plementariedad" ("RDC") intercaladas con:i regiones que estÆn mÆs conservadas,
den minadas "regiones estructurales" ("RE"). La extensiOn de las RE y RDC se ha de nido con precisiOn (ver Kabat et al. (1991) Sequences ofProteins ofImmunological rest, 5’ EdiciOn, U.S. Department ofHealth Human Services, NIH Publication No. 91 3242; y Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917, que se incorporan aqul
co a referencia). Cada VH y YL estÆ compuetapor tres RDC y cuatro RE, ordenadas
de de el extremo amino al extremo carboxi, en el orden siguiente: FRI, CDR1, FR2, C R2, FR3, CDR3, FR4.

10 1041 El anticuerpo puede incluir aemÆs una regiOn constante de cadena p sada y liviana para fonnar una cadena inmunoglobuilnica pesada y liviana, r spectivameitte. En una realizaciOn, el anticterpo es un tetrÆmero de dos cadenas de
i unoglobulina pesada y dos cadenas de inmunoglobulina liviana, mientras quo las
c denas de inmunoglobulina pesada y liviana estÆn interconectadas, par ejemplo por jones disulfuro. La region constante de adena pesada comprende tres dominios, Hi, CH2 y CH3. La region constante de cadena liviana comprende un dominio, CL. a region variable de las cadenas pesada y liviana contiene tin dominio de union que teractÆa con un antigeno. Las regiones constantes de los anticuerpos por lo general ctàan como mediadoras de la union del anticuerpo con los tejidos anfitriones o

II

-43- 4 -

factor s, incluso varias cØlulas del sistema inmuile(por ejemplo, las cØlulas efectoras) y el pri or componente (Clq) del sistema de compiemento clÆsico.

[0010 1 El tØrmino inmunoglobulina se refire a una proteina quo comprende uno
o m’ polipØptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Los
gene de inmunoglobulina humana reconocidos incluyen los genes do regiOn constantes kapp, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gamma (IgO, IgG2, IgG3, IgG4), delta, epsilon y mu, asi como una cantidad do genes do region variable do inmunoglobulina. Las "Ca as livianas" do inmunoglobulina do longitud completa (airededor do 25 Kd, o 214 aminoÆcidos) estÆn codificadas or un gen ide regiOn variable en ci extremo NH2 (air dedor de 110 aminoÆcidos) y un gen do rgiOn constante kappa o lambda on el
ox mo COOH. Las "eadenas pesadas" de irimunoglobulina de longitud completa
(ap oximadamente 50 Kd, o 446 aminoÆcidos) estÆnsimularmente codificadas por un
g de region variable (unos 116 aminoÆcidos) uno de los otrosgenes mencionados de
to On constante, por ejemplo, gamma (codificndo unos 330 aminoÆcidos),Los genes
de regiOn constante de cadena pesada do inmitnoglobulina codiflean para la clase do an cuerpo, es decir, el isotipo (por ejemplo, 1gM o IgGi). El fragmento de uniOn a an ’geno do un anticuerpo (o simplernente "poroiOn de anticuerpo" o "fragmento")
Co o se usa on este documento, so refiere a uno o mÆs fragmentos de un anticuerpo de
lo gitud completa quo retiene la habilidad pa -a ligarse especIflcamente a un antIgeno or çjemplo, CD3). Los ejemplos de fragmntos de union comprendidos dentro del t’ "fragmento de union a antigeno" de in anticuerpo incluyen, entre otros, (i) un gmento Fab, un fragmento monovalento quo comprende los dominios VL, VH, CL y Hi; (ii) un 1agmento F(ab’)2, un fragmento bivalente quo comprende dos fragmentos ab unidos par un puente disulfliro en la regiOn de articulaoiOn; (iii) un fragmento Fd consiste en los dominios VII y CHI; (iv) un fragmento Fv que consiste en los inios VL y VII de una sola rama do un anticuerpo (v) un fragmento dAb, que iste on un dominio VII; y (vi) una regiOn determinante de complementariedad
cia (RDC). AdeinÆs, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VII estÆn pot dos genes distintos, pueden unirse usando mØtodos recoinbinantes,
un ligador sintØtico quo les permite produeirse como una sola cadena proteica
/ en la cual las regiones VL y VET so aparoan para formar molØcuias monovalentes

14

-44- 44

como Fv de cadena simple; scFv). Tambin se pretende incluir a estos
antic erpos de cadena simple dentro del tØrniino "fragmento de union a ailtigeno" de un antic erpo. Estos fragnientos de anticuerpo so obtienen usando tØcnicas convencionales cono idas por los expertos en esta teenologla ylos fragmentos se seleccionan para obte er su utilidad do Ia misma manera quo los anticuerpos intactos.

[001 61 Las molØculas do anticuerpos para los polipØptidos del presente invento, pot jemplo, anticuerpos para la proteina de IL-17F, IL-17R o IL-17RC, pueden ser pro ucidos por niedio de mØtodos muy conocidos por los expertos en esta teenologia. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos mediante generaeión
do ibridomas do acuerdo con mØtodos conocidos. Los hibridomas formados de esta
in era se seleccionan entonces usando mØtodos estÆndar, tales como ELLSA, para
ide tificar uno o mÆs hibridomas que prcduzcan un anticuerpo quo se una es ecificamente a los polipØptidos del present’ invento. Por ejemplo, las proteinas de IL 17F del invento tambiØn pueden usarse para inmunizar animales con ci fin de ob ener anticuerpos policlonales y monoclonales quo reaccionen con la protelna do 17F y que puedan inhibit la, union de la IL-l7F (por ejemplo, homodimero de IL-17F
o eterodimero de IL-17A/IL-17F) con su receptor; pot ejemplo, IL-17R o IL-17RC. De
m era similar, las protelnas de IL-17R o IL-i 7RC pueden usarse para obtener
a ticuerpos policlonales y monoclonales que zeaccionen especificamente con la, IL- 17R o la IL-i 7RC, respectivamente, y quo puedan inhibir la union de esos receptores con la p oteina de IL-17F especificamente (incluso liomodimero do IL-17F y heterodImero de 17A/IL-17F); es decir, estos anticuerpos no inhiben la union de cualquiera de estos
r ceptores o de ambos con otros miembros de la familia de la IL-17F tales como ci omodimero do IL- 17A. AdemÆs, los inmunogenes peptIdicos pueden contener un esiduo do cistelna en el extremo carboxilo y pueden conjugarse con un bapteno tal omo la hemocianina del molusco "keyhole limpet" (KLH). Otros inmunogenes eptidicos pueden generarse al reemplazar los residuos de tirosina pot residuos do irosina sulfatada. Los mØtodos para sintetizar dichos pØptidos son muy conocidos. Un olipØptido de longitud coinpieta del presente invento puede usarse como ci inmunogen o, alternativamente, pueden usarse los fraginentos peptidicos antigØnicos de los polipØptidos. Un pØptido antigenico do un polipØptido del presente invento coinprende

- 45 -

at

45

me s 7 residuos continuos de aminoÆcidos

- al

y un epitope de manera tal que un
anticu rpo dirigido contra el pØptido forma un complejo inmune especifico con el polipØ tido. Lo ideal es que el pØptido antigØnico cbmprenda Un minimo de 10 residuos de a oÆcidosy esto mejora a medida que los reiduos aumentan a un minimo de 15, 20 y 0 residuos de aminoÆcidos.
[001 71 Los anticuerpos monoclonales pueden ser generados por otros mØtodos con idos por los expertos en la tecnologia de ADN recombinante. Como altemativa a la p -eparación de hibridomas secretantes de anticuerpo monoclonal, un anticuerpo mo oclonal para un polipØptido del presente invento puede identificarse y aislarse sel. ccionando un banco de imnunoglobulina combinatoria recombinante (por ejemplo,
un anco de exhibición de fagos de anticuerpos) con un polipØptido relacionado con ci
pr sente invento (por ejemplo, IL- 17F, IL- 17R, IL- 17RC) para de esa manera aislar los membros del banco de inmunoglobulina que Se ligan a los polipØptidos relacionados c n el presente invento (por ejemplo, IL-17F, L- 17R, IL- i 7RC, respectivamente). Las
t’ icas y kits disponibles comerciahnente para generar y seleccionar bancos de
e ibición de fagos son muy conocidos por los expertos en esta teonologla. AdemÆs, en
I literatura se pueden encontrar ejemplos de mØtodos y reactivos particularmente
decuados para su uso en la generación y selección de bancos de exbibición de uticuerpos. Por ejemplo, la tØcnica de ’’exhibición combinatorial de anticuerpos" es uy conocida y the desarrollada para identificar y aislar fragmentos de anticuerpos que presentaban una especificidad antigØnica particular y puede utilizarse para producir anticuerpos monoclonales. DespuØs de inmunizar un animal con un inmunogen como se describió anteriormente, se clona el repertorio de anticuerpos de la colección de cØlulas B resultantes. Generalmente se conocen mØtodos para. obtener la secuencia de ADN de las regiones variables de una poblacion diversa de molØculas de inmunoglobulina, usando una mezela de primarios oligómeros y PCR. Por ejemplo, se pueden usar primarios oligonucicØtidos correspondientes a las secuencias lider 5’ (pØptido de sefial) o secuencias de estructura 1 (FR1) asi como primarios a una region constante 3’ conservada, para amplificaciOn por PCR de las regiones variables de cadena pesada y liviana de numerosos anticuerpos murinos. Se ha utilizado una estrategia similar para

’1)

- 46 -

amplar las regiones variables humanas de cadena pesada y liviana de anticuerpos

hun/anos

[0 1081 Los sueros y anticuerpos policlonales pueden producirse al inmunizar un
sjeta adecuadO con un polipØptido del presente invento. El titulo de anticuerpos en el eta inniunizado puede monitorizarse mediante tØcnicas estÆndar,tales como ELISA, isando proteina inmovilizada. Si se desea, las molØculas do anticuerpos dirigidas contra un polipØptido del presente invento pueden aislarse del sujeto a del medio de cultivo y purificarse aün mÆs usando tØcnicas muy conocidas tales como la cromatografia de proteina A para obtener una fracción IgG.

[00109] Los fragmentos do anticuerpos para los polipØptidos del presente invento
pueden producirse por escisión do los anticuerpos de acuerdo con mØtodos ampliamente reconocidos. Pot ejemplo, los fraginentos Fab y F(ab’)z inmunológicamente activos pueden generarse tratando los anticuerpos con una enzima, coma puede sor la pepsina.

[001101 AdemÆs, los anticuerpos quimØricos, humanizados y de cadena simple
para los polipØptidos del presente invento, que comprendan porciones humanas y no humanas, pueden producirse usando tØcnicas estÆndar de ADN recombinante o un banco de inmunoglobulina combinatorial recombinante. Los anticuerpos humanizados tambiØn pueden producirse usando ratones transgØnicos quo sean incapaces do expresar genes de cadena pesada y liviana de inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes humanos do cadena pesada y liviana. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales humanos (Mm) dirigidos contra, pot ejemplo, la proteina do IL-17F, pueden ser generados de mejor manora si se utilizan ratones transgØnicos portadores do genes do inmunoglobulina humana en lugar de genes do inmunoglobulina murina. Los esplenocitos de estos ratones transgØnicos inmunizados con el antIgeno de interØs pueden entonces sor usados para producir hibridomas quo secreten Acm humano con afinidades especIficas para epitopes do una proteina humana.

[001111 Las anticuerpos quimØricos, incluso las cadenas de inmunoglobulina
quimØrica, pueden set producidos pot tØcnicas do ADN recombinante conocidas. Par ejemplo, un gen que codifica la region constante Fc do una molØcula do anticuerpo monoclonal niurino (a de otras especies) es digerida con enzimas do restticción para

[I

47

etraer la region codifleante de Fe murino y $e sustituye la porciOn equivalente de un gnque codifique una region constante Fc humana,

[t01 121 Un anticuerpo o una cadena de inmunoglobulina puede humanizarse txediante mØtodos conocidos. Los anticuerpos humanizados, incluso las cadenas de i munoglobulina humanizadas, pueden set generados al reemplazar secuencias de la r variable Fv que no participen directamente en la uniOn del antIgeno por s cuencias equivalentes de regiones variables Fv humanas. Los mØtodos generales para enerar anticuerpos humanizados son proporcionados pot Morrison (1985) Science 29:1202-07; Oi et al. (1986) Bio7’echniques 4:214; Queen et al., N° de Patentes de EJJ[J. 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762, cuyos contenidos se incorporan en este ocumento como referenda. Estos mØtodos incluyen aislar, manipular y expresar las ecuencias de Æcido nucleico quecodiflean t das o partes de las regiones variables Fv e inmunoglobulina de al menos una cadena pesada o liviana. Las fuentes de tales ecuencias de Æcido nucleico son conocidaspor los expertos en esta teenologia y pueden btenerse a partir de un hibridoma que produce un anticuerpo para un blanco redeterminado. El ADN recombinante que oodifica los anticuerpos humanizados o sus fragruentos puede entonces ser clonado en ult vector de expresiOn apropiado.

[00113) Las molØculas o las inmunoglobulinas de anticuerpos humanizados o injertados on RDC pueden producirse por injertos RDC o sustitución RDC, donde una, dos o todas las RDC de una cadena de irimunoglobulina pueden ser reemplazadas. Vet Patente de EE.U1J. N° 5.225.539; Jones et al. (1986) Nature 321:552-25; Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534; Beidler et aL (1988) J. Immunol. 141:4053-60; Winter, Patente de EEUU. N 5.225.539, cuyo contenido se incorpora on este documento como referencia. Winter describe un mØtodo de injerto RDC que puede usarse para preparar los anticuerpos humanizados del presente invento (Solicitud de Patente de Gran Bretafia 2188638A; Winter, Patente de EE.UT.J. N’:5.225.539), cuyos contenidos se incorporan aquf como referencia. Todas las RDC de un anticuerpo bumano on particular pueden ser reemplazadas pot al inenos una porciOn de una RDC no humana o solo algunas de las RDC pueden ser reemplazadas por RDC no humanas. SOlo es necesario reemplazar la

- 48 -

cantilad de EDC necesaria para unir los anticuerpos humanizados a un antigeno predtenninado.

[001 41 TambiØn se pueden utilizar animales transgØnicos no humanos moc4ifioados para producir anticuerpos para humanos en lugar de los anticuerpos endtgenos del animal en respuesta al estimulo del antigeno. (Ver publicación PCT WO 94/ 2602) Los genes endógenos codifleadores de cadenas de imnunoglobulina livianas y p sadas del huósped nb humano se incapacitan y los sitios activos codificadores de cad nas livianas y pesacias de inmunoglobulina humana se insertan en el genoma del hu ped. Se incorporan los genes humanos, por ejemplo, utilizando cromosomas arti ciales de levadura que contienen los segmentos de ADN humaiis necesarios. Un .i al que brinda todas las modificaciones deseadas se toma como progenie para la con animales transgenicos con menos modiflcaciones. El animal no humano ferido segün los trabajos realizados es ci ratOn y se lo denomina XENOMOUSETM ’n publicaciones de PCT WO 96/33735 y WO 96/34096. Este animal produce ulas B que secretan inmunoglobulinas completaniente humanas. Los anticuerpos se eden obtener directamente del animal luego de la inmunizaciOn con un inmunogen de erØs como, por ejemplo, una preparaeiOn: anticuerpo policlonal, o a partir de lulas B inmortalizadas derivadas del animtl, tal come hibridomas productores de ticuerpo monoclonal. AdemÆs, los genes codificadores de las inmunogiobulinas con iones humanas variables pueden recuprarse y expresarse para obtener los ticuerpos directamente o pueden modificarse am mÆs para obtener anÆlogos de ticuerpos tales come molculas Fv de cadena simple.

J1151 Los anticuerpos monoclonalesl quimØricos y humanizados que han sido)difieados al eliminar, afladir o sustituir otras porciones del anticuerpo, por ejemplo, regiOn constante, tamblØn entran dentro del alcance del invento. Entre otros ejemplos, anticuerpo puede ser modificado al elimjnar la region constante, al reemplazar la ión constante per otra (por ejemplo, una region constante destinada a aumeutar la mivida, la estabilidad o la aflnidad del anticuerpo, o una region constante de otra pecie o clase de anticuerpo) y al modiflcar uno o mÆs aminoÆcidos en la region

- 49

istante para modificar, por ejemplo, la eantidad 4e sitios do glicosilacion, la función
las cólulas efectoras, la union al receptor Fc (PeR), la fijación del complemento, etc.

161 Los mØtodos para modificar una regiOn constante do anticuerpo son
cidos. Los anticuerpos con fiineiOn moditicada (por ejemplo, afinidad inodificada S un ligando efector, como FcR en una cØlula, el componente Cl del complemento)
den ser producidos al reemplazar al menos un residuo aminoÆthdo en la porción
c$rnstante del anticuerpo por otro residuo (vpr PE 388.151 Al, EE.UU. 5.624.821 y
FE.UU. 5.648.260, cuyos contenidos so inorporan aquf como referencia). Pueden
ajiicarse tipos siznilares de modificaciones ccnocidas a la inniunoglobulina murina (o
e otras especies) para reducir 0 eliminar estas funciones.

)01171 Por ejemplo, es posible modificar la afinidad de una region Fe de un
nticuerpo (por ejemplo, una IgG, como una humana) por un FcR (por ejemplo, Fe amma RI) o por la conjugación con Clq a! reemplazar los residuos especificados por no o mÆs residuos quopresenten una funcioialidad apropiada en Sn cadena lateral o al itroducir un grupo funcional cargado, tat como glutamato 0 aspartato, o un residuo romÆtico no polar, tal como fenilalanina, tiosina, friptofano o alanina (ver EE.UU. .624.821).

)01181 Los anticuerpos anti-IL-17F, anti-IL-17R 0 anti-IL-17RC del invento
ueden ser ütiles pant aislar, purificar o dthctar protelna do IL- i 7F (por ejemplo, en structura monOmera, homodImera o heteodftnera), polipØptidos de IL-17R o do i- 17RC, respectivamente, en ci sobrenadante, lisado celular 0 en la superficie celular. os anticuerpos presentados en este invento tambiØn pueden usarse en diagnOstico para tonitorizar par ejemplo las concentraciones de proteina do IL-17F, como parte de un to clinico do prueba a para actuar cilnicamente sobre un modulador
do una cØlula o tejido que comprenda el antigeno del anticuerpo. Por
ejemplo, un elemento terapØutico, coma una, molØcula pequefia, u otro elemento terapØutico del invento, puede ser ligado a tin anticuerpo anti-IL- 17F, anti-IL- 17R a anti-ILl 7RC para poder dirigir el elemento terapØutico a la cØlula o tejido que exprese IL-17F, IL-17R a IL-17RC, respectivamente. Los anticuerpos antagonistas (preferiblemente anticuerpos monoclonales) que so ligan a la protelna de IL-17F,

M

- 50-

17R o IL- 17RC tambiØn pueden ser ütilŁs en el trataniiento de enferinedad/es ieionadals con la seflalización de IL- 17F o enfermedadles asociadas con la

Iización de IL-21 (por ejemplo, la uniOn do IL-21 con TL-21R y la activación de ü ltima) debido a la relación entre la producciOn de IL-21 y de IL- 17F. Pot ;iguiente, el presente invento proporciona ademÆs composiciones que comprenden anticuerpo inhibidor que se tine especificamente con IL- 17F (en estructuras rOmeras o dimeras), IL, 17R o IL-17RC que reduce, limita, bloquea o disniinuye la ilización de IL, 17F. De manera similar, los anticuerpos anti- IL- 17F, anti-IL-17R o ti-IL- 17RC pueden ser itiles para aislar, purificar, detectar o monitorizar la IL- 17F,
- 17R o IL- 17RC, respectivamente, o dirigir cilnicamente un modulador terapØutico a a cØlula o tejido que incluya IL- 17F, IL- i 7R o IL- 17RC, respectivamente.

001191 AdemÆs de los anticuerpos para utilizar en el invento, las molØculas de ticuerpos tambiØn pueden utilizarse para modular la actividad do homodimeros de IL-7F, homodimeros do IL-i 7A y homodimeros de IL- 17F/IL- 17A. Estas molØculas ncluyen drogas inmunofarmacØuticas modulates pequefias (SMIP) (Trubion harmaceuticals, Seattle,. WA). Los SMIP son polipØptidos de cadena simple compuestos por un dominio de union pai* una estruetura relacionada, tal como un antigeno, contrareceptor o similar, una region do uniOn polipeptidica con uno o sin residuos de cisteina y dominios CEE2 y CH3 do inmunoglobulina (vet www.trubion.com). Los SMIP muesiran la’especiflcidad de la uniOn y la actividad de anticuerpos monoclonales pero su tamaflo eis aproxiinadamente un tercio a la mitad del tamaflo de los anticuerpos nionoclonales terapØuticos convencionales y tienen una extensa media vida in vivo. Los SMIP y 5US usos y aplicaciones se encuentran en la Solicitud do Patente de EE.UTJ. N° 200310118592, 2003/0133939, 2004/0058445, 2005/0136049, 2005/0175614, 2005/0180970, 2005/0186216, 2005/0202012, 2005/0202023, 2005/0202028, 2005/0202534, 2005/0238646, como asi tambiØn en docuinentos de patentes relacionados, cuyo contenido ha sido incorporado en su totalidad en este documento como referenda.

- 5151 -

doe seleeción

1201 Los polinucleótidos y polipØptidos relacionados con la seflalización de 17F pueden usarse en ensayos de selección para identificar agentes farmacológicos o apuestos priniarios para agentes que scan capaces de modular la actividad do ía 17F en una cØlula u orgrnismo y que, por consiguiente, scan reguladores potenciales las respuestas inflamatorias. Por ejemplo, las muestras quo contienen IL-17F (sea tural o recombinante) pueden ponerse en contacto con uno do muchos compuestos de rueba (scan agentes biológieos o molØculas orgÆnicas pequeflas), y la actividad iológica de IL-17F on cada una do las muestras tratadas puede compararse con la biológica de IL- 17F en muestras no tratadas o en muestras puestas en contacto diferentes compuestos de prueba. Dichas comparaciones determinarÆn si alguno de compuestos de prueba resulta en: 1) un grado considerablemente reducido de presión o de actividad biológica de la I- 17F, indicando asI un antagonista de la 17F, o 2) un grado sustanciahnente mayr de expresión o de actividad biológica de IL- 17F, indicando asI un agonista do la IL- 17F. En una realizaeión, la identiflcación compuestos do prueba capaces de modular la actividad do la IL-17F se realiza mdo pruebas de selección de gran rendithiento, tales como los ensayos BIACOREfi iacoro International AB, Uppsala, Sueia), BRET (transferencia de energia do onanoia de bioluminiscencia) y FRET (ransferencia de energia de resonancia de orescencia) asi como ELISA y ensayos basados en cØlulas.
pequefias

[001211 TambiØn puede lograrse una actividad reducida do la IL- i 7F (o al menos una actividad asociada eon la union do la IL-21 con la]L-21R y la activaciOn do esta) on un organismo (o sujeto) quo sufre (o corre riesgo de sufrir) trastornos)nados con la sefializaciOn de IL-17F: (o trastornos asociados con la uniOn de la]L-21 con la IL-21R y la activación do esta uiltima), por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoidea, rechazo de trasplantes, psoriasis, etc. o en una cØlula do tal organismo (o sujeto) impliçado en tales trastornos, mediante ci uso de molØculas pequeæas (normalmente molØculas orgÆnicaspequefias) que antagonizan, es decir, inhiben la actividad de la 1L 17F. Pueden identificarse nuevas molØculas

- 52 -

iistas pequefias pot los mØtodos de selecciôn descritos anteriormente y pueden
en los mØtodos de tratamiento del presente invento que se desoriben en este documento.

1001221 Por el contrario, tambiØn puede lograrse un aumento de la actividad de la IL- 17F (o de una actividad asociada con la IL-21) en un organismo (o sujeto) que sufre (o corre riesgo de sufrir) una deficiencia inniune, pot ejemplo, neutropenia, o en una cØlula de dicho organismo (o sujeto) implicado en tal trastorno, niediante ci uso de molØculas pequei’ias (normaimente mo16ciilas orgÆnicas pequefias) que favorecen la actividad de la IL- 17F. Pueden identifie&rse nuevas molØculas agonistas pequefias mediante los mØtodos de selección descritos anteriormente y pueden usarse en los mØtodos de tratamiento de deficieneias inmunes, pot ejemplo, como se describe en N° de Patentes de EE.UU. 5.707.829; 6.04.344; 6.074.849 y Solicitud de Patente de EE.U[J. No 10/102.080, las cuales se incorporan aqui en su totalidad como referencia.

[001231 El tØrmino "molØcula pequeiia" se refiere a compuestos que no son macromolØculas (ver Karp (2000) Bioinfoimatics Ontology 16:269-85; Verkman (2004) AJP-Cell Physiol. 286:465-74). Pot co1siguiente, se consideran a menudo como molØculas pequeuias a aquellos compuestos que pesan, pot ejemplo, menos de mil daltones (Voet y Voet, Biochemistry, 2a.ed., Ed. N. Rose, Wiley y Sons, New York, 14 (1995)). Davis et al. (2005) Proc. Natl.’ Acad. Sci. USA 102:5981-86, usa la frase "molØcula pequefla" para ndiear folatos metotrexato y neuropØptidos, mientras que Halpin y Harbury (2004) PLos Biology 21022-30, usan la frase para indicar productos genØticos de molØcula pequefla, por ejemplo ADN, ARN y pØptidos. Entre los ejemplos de molØculas pequefias naturales Se encuentran, entre otras, colesteroles, neurotransmisores y ARNsi. Las molØculas pequeflas sintetizadas incluyen, entre otras, varios agentes quimicos enumerados en vanes bancos de dates disponibles comercialmente de rnolØculas pequefias; pot ejemplo, FCD (Fine Chemicals Database), SMID (Small Molecule Interaction Database), ChEBI (Chemical Entities of Biological Interest), y CSD (Cambridge Structural Database) (vet Alfarano et al. (2005) Nuc. Acids Res. Database Issue 33:D416-24).

- 53H

para el diagnóstieo, pronóstico y thonitoreo de la progresión de trastornos con la sefialización de IL- i 7F

Se conoce que los mecanismos ininunológicos estudiados en los modelos particularmente en los modelos iiurinos, pueden ser y con freØuencia son s al sistema inixiune humano. Como tal, aunque machos de los ejemplos
s on este documento demuestrai la eapacidad de los antagonistas de la n de IL-17F para inhibir las ioactividades de la IL- 17F en modelos
s, ademÆs demuestras humanas, 10 mØtodos presentados para ci diagnóstico,
ico y monitoreo de trastornos relaciOnados con la sefialización de IL- 17F serÆn particularmente iltiles para diagnosticar,
seres humanos.

y monitorizar dichos trastornos en

[00125] El presente invento ofrece m&odos para diagnosticar, pronosticar y monitorizar el progreso de trastornos reiaciónados con la sefializaeión de IL-17F on an sujeto (por ejemplo, que implique directa 0, indireetamente aumentos on la bioactividad de la IL- 17F) al detectar an aumento on la actividad de la IL- 17F (por ejemplo, al detectar an aumento en la regulación de IL -17F) incluso, entre otros, ci uso de diehos inótodos on humanos. Debido a la re1aci6n directa entre IL-21 e 1L-17F, ci invento proporciona tambiØn m&odos para diagnosticar, pronosticar y monitorizar el progreso de trastornos asociados con la union de la IL-21 con la IL-21R y la aotivaciOn do esta ü ltima en an sujeto (par ejernplo, que implique directa a indirectamente aumentos en la bioactividad de la 1L-2 1) al detectar an aumento en la actividad de IL- i 7F (por ejemplo, al detectar an aumento en la regulaciOn de IL- I 7F) incluso, entre otros, el uso de tales mØtodos en hunianos. Estos mØtodos pueden ilevarse a cabo con los kits de diagnOstieo preempacados que tienen al menos uno de los miembros del grupo con un polinucleOtido de IL-i 7F, IL- i 7R a IL- i7RC a fragmentos del mismo, an polipØptido de IL- i 7F, IL- i 7R o IL- i7RC a fragmentos del mismo (incluso sus protelnas de fusion) o anticuerpos para an polipØptido do 1L-17F, IL-17R o IL-17RC o sus derivados a moduladores de polinucleOtidos a polipØptidos de IL-17F, IL-17R a IL-17RC como se describe en este documento, que resultan may prÆcticos,par ejemplo, on an ambiente clinico. Los expertos reconocerÆn que se pueden usar otros mØtodos indireotos para

0

- 54-

confirmar el aumento en la regulacion de 14 IL-17F, como por ejemplo contar ci nümero de cØlulas inmunes tales corno los neutrófilos.

[001261 "DiagnØstico" o "diagnoticar" significa identificar la, presencia a
ausencia de una patologia. Los mØtods de. diagnóstico incluyen la detección del aumento de la sefa1izaci6n de IL- 17F (ó de IL-21) mediante la deterniinaoión de una cantidad medida de los produetos genØtioos (por ejemplo, ARNm, ADNc o polipØptido y sus fragmentos) de IL-17F, IL-17R o 17L-17RC on una muesira biológioa de un sujeto (mamIfero huinano o no humano) y la, comparación de la cantidad medida con una cantidad o rango de valores normales decir, una cantidad o rango de valores de uno o varios individuos que no presenten trastornos relacionados con Ia sefiaiización de IL- 17F). Aunque un mØtodo diagnóstico en particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de los trastornos relacionados con la serializacion de IL-17F, es suficiente si ci mØtodo ofrece una indicación positiva quo ayude on ci diagnOstico.

[00127] El presente invento tarnbiØn presenta mØtodos para ci pronóstico de
dichos trastornos a! detectar el aumnto de la actividad de IL-17F, por ejemplo, al detectar el aumento de IL-17F, IL-17R o IL- 17RC. "Pronóstico" o "pronosticar" significa prover ci curso o severiad probables de una patologia. Los mØtodos pronØsticos inciuyen determinar la cantidad medida de an producto genØtico de IL- i7F, IL-17R o IL-17RC en una muestra biológica de un sujeto y compararia con la cantidad medida de una cantidad o rango de valores pronósticos (es decir, turn cantidad a rango de valores obtenidos de individuos con severidades variables de trastornos relacionados con la sefialjzación de IL-17F a de trastornos asociados con la sefia lización de IL-21) para ci producto genØtico de IL-17F, U--17R a IL- I 7RC, respectivamente. Diversas cantidades de producto genØtico de IL-17F, IL-17R o IL-17RC on una muestra se corresponden con detenninados pronósticos para trastornos relacionados con Ia seflalización de H-,1 7F o para trastornos asociados con la seflalización de IL-21. La detección de una cantidad de producto genØtico de IL-17F, IL-17R o IL-17RC a un nivei pronóstico en particular, proporciona un pronóstico para ci sujeto.

1001281 El presente invento tambiØn ofrece mØtodos para controlar ci progreso a
ci curse de tales trastornos relacionados con la sefialización de IL- 17F (o de trastornos

- 55 -

ciados con la seflalización de IL-21) ali detectar ci aumento de la actividad de 17F, por ejemplo, at detectar ci aumento de IL-I7F, IL-17R o IL-i7RC. Los Øtodos de control incluyen determinar las cantidades medidas de un producto genØtico e IL-17F, IL-17R o IL-17RC en muestras biologicas tomadas de un sujeto en una rimera o segunda vez y comparar las can$dades. Un cambio en la cantidad de un roducto genØtico de 1L-17F, IL-17R o IL17RC entre la primera y la segunda vez ndica un carnbio on ci curso de los trastomos relacionados con la sefialización de
17F (o trastornos asociados con la sef’ialización de IL-21), concretaniente una
reducción on la cantidad indica la remisiói de dichos trastornos y un aumento on la cantidad indica la progresión de los inismos. Dichos ensayos de control tambiØn son titiles para evaluar la eficacia de una interv4nci6n terapØutica en particular en pacientes en tratamiento por trastornos autoinniunes.

[001291 La sefiaiización en aumento de IL- 17F on los mØtodos mencionados
anteriomiente puede detectarse en una variedad de muestras bioiógicas, incluso liquidos corporates (por ejemplo, sangre completa, plasma y orina), c1uias (por ejemplo, cØlulas enteras, fracciones de cØlulas y extractos celulares) y otros tejidos. Las muestras biológicas incluyen tambiØn secciones dł tejido, tales como biopsias y secciones congeladas obtenidas para fines histolOgicos. Las muestras biológicas preferidas incluyen sangre, plasma, linfa, biopsias tistüares, orina, LCR (liquido cefalorraquideo), liquido sinovial y LBA (lavado broncoalyeolar). Se apreeiarÆ quo ci anÆiisis de una muestra biológica no requiere necesariarnente la extracción de cØlulas o tejidos del sujeto. Por ejemplo, pueden administrarse a un sujeto agentes marcados de manera apropiada que unan productos gen&icos dc la seflalización de IL-17F (per ejemplo, anticuerpos, Æcidos nucleicos) y se los puede visualizar (cuando estØn ligados a un blanco) con la teonologla estÆndar de obtención de imÆgenes (per ejemplo,TAC, RMN (IRM) y PET).

[001301 En las pruebas de diagnóstico y de pronOstico del presente invento, ci
producto genØtico de IL- 17F, IL-17R o IL- 17RC se detecta y cuantifica para obtener una cantidad medida. La cantidad medida se compara entonces con una cantidad o rango de valores normales. Una cantidad considerablemente superior a la cantidad o at

- 5 -

de valores normales es un signo positivo on el diagnóstico de trastornos rados con la seflalización de IL- i 7F (o los trastornos asociados con la union de
1 con IL-21R y la activaciOn de esta OJtima). MÆs adelante se describen los todos especificos de detecciOn y euantificción de los productos genØticos de IL- 17F,

17R o IL- I7RC.

[001311 Se pueden determinar las cantidades normales o valores basales de los
productos genØticos do IL-17F, IL-17R o I1-17RC para cualquier tipo de muestra y poblaciOn en particular. Generalmente, los’ valores basales (normales) de proteinas o ARNin do IL-17F, IL-17R o IL17RC se determinan midiendo las cantidades respectivas de proteina o ARNm do IL- 171E, IL- i7R o IL- 17RC en tin tipo de muestra biolOgica obtenida de sujetos normales (es’ decir, sanos). Como alternativa, los valores normales de productos genØticos do IL- 17F, IL-17R o IL- 17RC pueden determinarse midiendo la cantidad en cØlulas o tejidos sanos tomados del mismo sujeto del cual se obtuvieron las cØlulas o tejidos do prueba enfermos (o posiblemente enfermos). La cantidad do productos genØticos do IL-17F, IL-17R o IL-I7RC (sean las cantidades normales o la cantidad medida) puede determinarse o expresarse por cØluIa, por proteina total o por volurnen. Para determinar la cantidad de cØlulas en una muestra, se puede medir la concentración do tin producto genØtico expresado constitutivamente o de otro producto genØtico expresado a conoentraciones conocidas en cØlulas del mismo tipo quo las cØlulas de donde so tomO la muestra biolOgica.

[001321 Se apreciarÆ que los mtodos de ensayo del presente invento no
requieren necesariamente la mediciOn de valores absolutos do productos genØticos de IL-17F, IL-17R o IL-i7RC porque los valores relativos son suflcientes para muchas aplicaciones de estos mØtodos. TambiØn se apreciarÆ que, ademÆs do it cantidad o abundancia do productos genØticos de IL-17F, IL-17R o IL-17RC, pueden identifloarse productos genØticos variantes o anormales de IL- 17F, IL-17R o IL-17RC o sus patrones de expresión (por ejemplo, transcriptos mutados, polipØptidos truncados) eomparÆndoloscon productos genØticos y pairones de expresiOn normales.
[001331 El hecho de quo en dos muestras la expresiOn de tin gen en particular sea
significativamento similar o significativamente diferente, por ejemplo,

- 57 -

ificativamente superior a significativamente inferior a un valor dado, depende del y, entre otras cosas, de las variaciones de su expresión entre individuos a muestras -entes. La experiencia en esta teenologia seth Ia que permita determinar Si los les de expresión son significativamente similares a diferentes. Se pueden tener en ta factores tales coma la variaciÆn gn&ica, por ejemplo, en los niveles de esión de IL-17F a IL-17A, entre individuos, especies, órganos, tejidos a cØlulas ndo y donde sea necesario) al deterniinar si el nivel de expresión, par ejemplo, de 17F a IL-i 7A, es significativamente similar o significativamente diferente entre dos nuestras, pot ejemplo, si es significativamente superior a un nivel dada. Como resultado de la heterogeneidad natural en la expresión genØtica entre individuos, especies, Organos, tejidos o cØlulas, las frass tales como "significativamente similar" a "significativamente superior" no pueden defmirse como un porcentaje o valor preciso, sino mM bien puede ser establecido por tin experto en esta tecnologIa al poner en prÆcticaci invento.

[00134] Los ensayos de diagnósticô, de pronóstico y de control del presente invento se realizaron para detectar y cuantificar los productos genØticos de IL-17F, IL- i 7R a IL- 17RC en muestras bioiogicas Los productos genØticos de IL- 17F, IL- i 7R a IL-17RC incluyen ARNm y polip6ptidoo y anibos pueden medirse al utilizar mØtodos conocidos por los expertos en esta teenologla.

[00135] Por ejemplo, ci ARNm pude detectarse y cuantificarse directamente con ensayos basados en]a hibridaciOn, como hibridación Northern, hibridación in situ, inmunotransferencias de mancha y de ranura y conjuntos de oligonucleótidos. Los ensayOs basados en la hibridaciOn se refieren a pruebas on las cuales se hibrida una sonda de Æcido nucleico con un Æcidonucleico blanco. En algunos formatos, ci blanco, la sonda a ambos son ininovilizados. El Æcido nucleico imnovilizado puede ser ADN, ARN u otro oligonucleotido a polinucleótido y puede comprender nucleótidos naturales o no naturales, anÆbgos de nucieótidos a colunmas. Los mØtodos para seleccionar secuencias de sonda de Æcido nucleico parausar on ci presente invento se basan en la secuencia de Æcido nucleico de IL-17F, 1L-17R o IL-17RC y son conocidos en esta teenologia.

I

[001361 Como alternativa, el A1Nm uede amplificarse antes de la detección y cuantificación. Estos ensayos basados on la 1mplificaci6n son conocidos e incluyen la reaeción en cadena de polimerasa (RCP), la /RCP-transcripción inversa (RCP-TI), RCP-EUSA y reaceión on cadena de ligasa (Rc). Los primarios y sondas para producfr y detectar productos gen6ticos amplificados 4e IL-17F, IL-17R o IL-17RC (pot ejemplo, ARNm o ADNc) pueden set disefiados y piducidos fÆcilmentepor los expertos en esta teenologia sin realizar experimentos innecsarios, basÆndoseen las secuencias de Æcido

nucleico de IL-17F, IL-17R o IL- 17RC, / respectivamente. Entre otros ejemplos, las productos genØticos amplificados de fl-t7F pueden analizarse directamente, por ejemplo, por electroforesis de gel, por hib-ida.ción con una sonda de Æcidonucleico, pot secuenciaciOn, par detecciOn de una sefil fluorescente, fosforescente o radioactiva, o por cualquiera de una variedad de meto4os conocidos. AdemÆs, los expertas conocen mØtodos para aumentar la sefial produci por ampliflcación de las secuencias de Æcido
nucleico blanco. Una persona experta en/ esta teonalogia reconocerÆque cualquiera sea

el mØtodo de amplificación utilizado, I se puede aplicar una variedad de mØtodos
cuantitativos conocidos (pot ejemplo.CP cuantitativa) si se desea cuantificar los
productos genØticos.

[00137] Los polipØptidos de 17F, IL- 17R o IL-17RC (a sus fragmentos)
. pueden detectarse usando diversos on ayos inmunológicos conocidos, empleando los anticuerpos respectivos anti-IL-I 7F, ti-IL- 17R o anti-IL- i7RC que pueden generarse
como se describió anterionnente. Los nsayos inmunológicos se refleren a pruebas que
utilizan un anticuerpo (por ejemplo, oliclonal, monoclonal, quiinØrico, humathzÆdo,
scFv a sus fragmentos) que se onjuga especificamente, par ejemplo, con un
polipØptido de IL-17F (o uno de sus/ fragmentos). Dichos ensayos inmunológIcos tan
conocidos y adecuados pam la rÆctica del presente invento incluyen ELISA, radioinmunoensayo (RIE), inmunaprcipitación, rnmunofluorescencia, ordenamiento de cØlulas activadas por fluorescencia ACS) y anÆlisisde inmunotransfereneia.TambiØn se puede detectar tin polipØptido de /IL-17F usando uno a varios polipØptidos marcados de IL-17R a IL-17RC. Por otra part, IL-17R o IL-17RC pueden ser detectados usando tin polipØptido marcado de IL-17F.

- 59-

138J Una persona experta en esta tecnologia entenderÆ que los m&odos icionados pueden aplicarse a trastornos relacionados con la sefialización de IL- i 7F.

)S terapØuticos de las molØculas relacionadas con la sefalización de IL- 17F

1391 Estos inventores son los prirneros en demostrar, entre otras cosas, lo siguiente: 1) la union de IL- 17R o IL- I7RC por IL- 17F u otros agonistas de IL- 17F se relaciona con el aumento de la inflltraciOn de neutrOfilos, destrucciOn del cartliago, etc.;
2) bs anticuerpos dirigidos hacia TL-17F pueden usarse para detectar la proteina de IL-17F e inhibir al menos una bioactividad 4e]L-17F; 3) puede usarse ARNsi dirigido a IL- l7Ry IL, 17RC para disminuir la bioactividad de IL-17A y IL-17F; 4) la proteina de IL- 17F puede forrnar un bomodimero de L- 17F y un heterodimero de IL- 17A/IL- 17F y, por ende, los anticuerpos inhibidores dirigidos a IL-17F tambiØn pueden inhibir la bioactividad de IL-17A que es mediada por los heterodimeros de IL-17A/IL-17F; 5) IL-21 actüa sinØrgicamente con CD28 para aumentar los homodhneros de IL-17A, homodImeros de IL-17F y heterodimeros de IL-17A/IL-17F y por consiguiente los anticuerpos que inhiben la actividad de IL-17F (por ejemplo, la actividad de homodimeros de IL-17F o la de heterodimeros de IL-17A/IL-17F) pueden regular la sefial de IL-21; 6) se pueden aislar y purificar los homodImeros naturales y recombinantes de IL- i 7A, los de IL- i 7F y los heterodimeros de IL, i 7A/IL- 17F; 7) los heterodimeros de IL- 17F poseen bioactividad de IL- 17F; 8) los anticuerpos contra IL-17F humana reaccionan en forma cruzada con IL- i 7F de primate y la neutralizan parcialmente; y 9) hay un aumento de 11,17F e EL-17A en los tejidos lesionales de pacientes humanos con psoriasis y los tejidos implicados en los pacientes humanos con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Aunque se han usado algunos inodelos animales para identificar algunas de las estas correlaciones, se sabe que los mecanismos inmunolOgicos estudiados en modelos animales pueden ser, y frecuentennte son, trasladables al sistema inmune humano. AdemÆs, los anticuerpos delinvento se usaron para aislar IL-I7F natural en sus estncturas homodimØrica y heterodimØrica a partir de cØlulas T primai-ias humanas, mientras que los experimentos sobre la regulaciOn de IL-17F de Agrecanasa y la clasificación de los niveles de expresión de IL-17A e IL-17F en lesiones psoriÆsieasy on tejidos afectados por la enfermedad inflamatoria intestinal se

ft7

- 60 -

realizaron en cØlulas y tejidos humarios. En consecuencia, los mØtodos presentados para usar niolØculas relacionadas con la sefialización de 111,17F, por ejemplo, agonistas de
]L-17F o antagonistas de seflalización de l]- 17F, para tratar trastornos relacionados con
La seæalización de IL- i 7F o asociados con la seæalización de IL-2 1, tendrÆn unautilidad
particular para el tratainiento de diehos tratomos en ci ser humano.
[001401 Las molØculas relacionadas con la scflalización de IL- 17F presentadas on
este documento, incluso las moduladoras de la actividad polinucleótida o polipeptida de

$U-,-17F, IL-17R o IL-I 7RC identificadas usando los niØtodos descritos anteriormente, pueden usarse in vitro, ex vivo o inctrporarse en composiciones farmacØuticas y
administrarse a individuos in vivo para fratar, por ejemplo, trastornos relacionados con
la sefialización de IL- i 7F o de IL-2 I, mediante Ia administración de un antagonista de
la seæalización de IL-17F (por ejemplo, iolinueleótidos inhibidores de IL-17F, IL-17R
o IL-17RC; polipØptidos solubles de IL-17R o IL- 17RC y sus fragmentos o proteinas de
fusion; anticuerpos inhibidores anti-IL-17F, anti-IL-17R o anti-IL-17RC; o molØculas
antagonistas pequeflas, etc.). Los expertos conocen diversos abordajes fannacogenOmicos que deben considerarse al determinar si se deben administrar
molØculas relacionadas con la seflalizaeiOn de IL- i 7F e incluyen la asociaciOn con todo
ci genoma, el abordaje de gen candidatb y la caracterización de expresiOn del gen. Una
, composiciOn farmacØutica del invento se formula para ser compatible con su via de administraciOn prevista (por ejemplo, las composiciones orales generalmente incluyen
tin diluyente inerte o tin portador comestible). Entre otros ejemplos de vias de
administración se incluyen la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa),
intradØrmica, subcutÆnea, oral (por ejemplo, por inhalación), transdØrmica (tOpica),
transmucosa y rectal. Las composiciones farmacØuticas compatibles con cada via de
administración prevista son muy conocidas.

[00141] Los agonistas de IL-17F o los antagonistas de la seflalizaciOn de 1L-17F pueden tarse como composiciones farmacØuticas cuando se combinan con tin portador farmacØuticarnente aceptable. Dicha composición puede contener, ademÆs de las niolØculas y portador relacionados con la sefLalizaciOn de IL-17F (por ejemplo, agonistas de IL-17F o antanistas de la sefialización de IL-17F), varios diluyentes,

- 61 -

re enos, sales, amortiguadores, estabilizantŁs, solubilizantes y otros materiales c nocidos. El tØrmino "fannacØuticamente aceptable" significa un material no tóxico, q e no interfere con la eficacia de la actividad biológica del o de los ingredientes a tivos. Las caracteristicas del portador depençeran de la via de administración,

1 01421 La composición farmac6utico del invento tambiØn puede contener
itocinas, linfocinas u otros factores hematopoyØticos, tales como M-CSF, GM-CSF,
- 1, IL-2, IL-3, 1L-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-b, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, G-CSF, factor de citoblastos y eritropoyethia. La composición farmacØutica tambiØn puede incluir anticuerpos anticitocina, como se describe mÆs detalladamente mÆs adelante. La composición farmacØutica puede contener factores trombolIticos o antitrombóticos, como activador de plasminógeno y Factor VIII. La composición farmacØutica puede contener tambiØn otros agentes antiinflamatorios como se describe mÆsadelante. Estos factores o agentes adibionales pueden incluirse on la composición farmacØutica para producir un efecto sinØtgico con agonistas de IL- 17F o antagonistas
de la seflalización de 1L 17F o para reducir al minima los efectos secundarios causados
por los agonistas de IL- i 7F o por los antagonistas de la sefialización de IL- i 7F. Par otra
parte, los agonistas de IL-17F o los antagonistas de la seflalización de JL-17F pueden
incluirse en formulas de la citacina, linocina, otros factores hematopoyØticos, factor trombolitico a antitrombótico a agente antiinflamatorio en particular para reducir al
S minimo los efeetos secundarios de la ditocina, linfocina, otro factor hematopoyØtico, factor trombolitico a antitrombOtico o agente antiinflamatorio.

[001431 La composiciOn farmacØutica del invento puede tomar la forma de un
liposoma, en el cual se combinan agonistas de IL- i 7F o antagonistas de la sefializaciOn
de IL-17F, ademÆs de otros portadores farmacØuticamente aceptables, con agentes anfipÆticostales como lfpidos que existen on forma agregada (micelas, monocapas insolubles, cristales liquidos o eapas de laminillas en soluciOn acuosa). Los lipidos apropiados para la formula liposómica incluyen, entre otros, monoglicØridos, diglicØridos, sulfÆtidos, lisolecitina,fosfoilpidos, saponina, Æcidosbiliares, etc.
[001441 Como se usa on este documento, el tØrmino "cantidad terapØuticamente
eficaz" significa la cantidad total de cada ingrediente activo de la composiciOn a el

62 -

mØtodo farmacØutico que es suficiente para deinostmr un beneficio significativo para el paciente; por ejemplo, el alivio de los sintomas, la curación o la disminuoión del tiempo necesario para la curación de tales afecciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado par si solo, el tØrmino so reflere solo a ese ingrediente. Cuando se aplica a una combinaciOn, ci tØrmino se reflere a las cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan como resultado ci efecto terapØutieo, sea cuando se administran en combinaeiOn, en serie a do manera simultÆnea.

[00145] Al poner en prÆctica ci mØtodo do Iratamiento o de uso del presente invento, se administra una cantidad terapØuticamente eflcaz do un agonista de IL- 17F a un antagonista do la sefializaciOn do IL-17F a un sujeto, por ejemplo, tin mamifero, un ser bumano. Puede administrarse una molØcula relacionada con la sefializaciOn de IL-17F de acuerdo al mØtodo del invento por 51 sola a combinada con otras terapias, tales coma los tratamientos que eipplean citocinas, linfocinas u otros factores hematopoyØticos o agentes antiinflamatorios. Cuando se administran concomitantemente con uno o mÆs agentes, los antagonistas de la seflalización do IL-17F pueden administrarse simultâneamente a secuencialrnente con el segundo agente. Si se administran secuencialmØnte, ci medico do cabecera debe decidir sabre la secuencia de administración apropiada, por ejemplo, un polipØptido do IL-17R a do IL-i 7RC (a su proteina de fusiOn) o el anticuerpo inhibidor en eombinaciOn con otros agentes.

[00146] Cuando se administra por via oral una eantidad terapØuticamente eficaz de un agonista do IL, 17F a antagonista de la seæalizaciOn de IL-17F, ci agente do uniOn estarÆen forma de comprimido, cÆpsula,polvo, soluciOn a elixir. Cuando so administra en forma do comprimido, la composiciOn farmacØutica del invento puede contener ademÆs un portador sOlido, como:una gelatina 0 un adyuvante. El comprimido, la cÆpsuia y ci polvo contienen entre 5 y 95% de agente agiutinante y preferiblemente entre 25 y 90% del mismo. Cuando se administra on forma liquida, puede aæadirse un portador liquido, coma agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal, coma aceite do mani, mineral, de soja a de sØsaino, o aceites sintØticos. La farina lIquida de la composiciOn farmacØutica puede tambiØn contener solución sauna flsiológica, dextrosa

- :63

u otra solución sacÆrida, o glicoles como el glicol etilØnico, glicol propilØnicos o glicol polietilØnico. Cuando se administra en forma lIquida, la composición farmacØutica contiene eritre aproximadamente 0,5 y’! 90% en peso del agente aglutinante y preferiblemente entre 1 y 50% on peso del mismo.

[001471 Cuando se administra por inyección intravenosa, eutÆnea o subcutÆnea una cantidad terapØuticamente eficaz de On agonista de IL- 17F o tin antagonista de la seflalización de IL- 17F, dicho agonista de

:

IL- i7F o dicho antagonista de la sefialización
de IL- 17F estarÆn on laforma de una solición acuosa sin pirógenos y parenteralmente aceptable. La preparación de tales solucines proteicas parenteralmente aceptables, en que se consideran debidannte ci pH, la isotonicidad, la estabilidad y factores siniilares, estÆ al alcance delos que trabajan eon eta teenologia. Una composición farmacØutica preferida para la inyección intravenosa, cutÆnea o subcutÆnea, debe contener, ademÆs del agonista de IL- 17F o tin antagonista de la, seuialización de IL- 17F, tin vehiculo isotónico, como cloruro de sodio inyectble, Ringer inyectable, dextrosa y cloruro de sodlo inyeetables, lactato de Ringer nyectable u otro vehIculo conocido en esta teenologla. La composición farmac6utic4 del presente invento puede contener tambiØn,

agentes estabilizadores, conservadores, i

i amortiguadores, antioxidantes u otros aditivos
conocidos por los expertos en esta tecnoLogIa.
1001481 La cantidad de agonista de IL-17F o de antagonista de seiialización de IL- i7F on la composición farmacØutica del presente invento dependerÆde la, naturaleza y severidad de la afección que Se estØ tratando y de la naturaleza de los tratamientos previos que haya recibido el paciente. En.iltima instaricia, ci medico de cabecera decidirÆ cuÆi serÆ la cantidad deagonista de IL- i 7F o de antagonista de la sefialización de IL- 17F con que se tratarÆ a cada paciente en particular. Inicialmente, el medico de cabecera administrarÆ dosis bajas de agonista de 1L-17F o de antagonista de la sefialización de IL - I 7F y observarÆ respuesta del paciente. Se podrÆn administrar dosis inayores de agonista de IL- i 7E o de antagonista de la sef&alización de IL- i 7F hasta lograrse ci efecto terapØutico 6ptimo para el paciente y, on ese momento, la posologla generalmente ya no se aumenta mÆs. Se contempla que las diversas composiciones farniacØuticas usadas para practicar el mØtodo del presente invento

deberÆn contener entre aproximadamente; 0,1 g y aproximadamente 100 mg de agonista de IL-17F o de antagonista de la seflalización de U, 17F, por ejemplo, M, 17R o IL- i 7RC (incluso sus proteinas de fusion) pot kg de peso corporal.

[00149] La duración de la terapia! intravenosa (Lv.) usando una composición lkrmacØutica de este invento variarÆ en fuiciOnde la gravedad de la enfennedad que se estØ tratando y del estado y respuesta idiosincrÆsica potencial de cada paciente on particular. Se contempla que la duraciOn de cada aplicación del agonista de 1L -17F o del antagonista de sefializaciOn de IL- 17F puede set de 12 a 24 horas de administraciOn Lv, continua. TambiØn se contempla la terapia subcutÆnea (s.c.) usando una composiciOn farniacØutica del presente invento. Etas terapias pueden administrarse a diario, semanalinente o, mÆspreferiblemente, cada dos semanas o mensualmente. TambiØn se contempla que, donde el agonista de IL- i 7F o el antagonista de la seflalizaciOn de LL-17F sea una molØcula pequefia (per ejemplo, para la administraciOn oral), las terapias podrÆn administrarse diarianente, dos veces al dia, tres veces al dia, etc. Finalmente, el medico de cabecera decdirÆ laduraciOn apropiada de la terapia i.v. o s.c. o de La terapia con una niolØcula pàquefia y los intervalos de administraciOn de la terapia usando la composición farmacutica del presente invento.

1001501 Se espera que los polinucleótidos y proteinas del presente invento exhiban uno o mÆs de losuses o aetividades biolOgicas (entre ellos, los asociados con los ensayos citados en este documento) que se identifican mÆs adelante. Los uses o actividades descritos para proteinas del presente invento pueden set proporcionados pot la administración o el uso de dichas proteinas o per la administración o el use de polinucleOtidos que codiflean dichas proteinas (come, per ejemplo, en las terapias genØticas o vectores adecuados para la introducción de ADN).

Uses de antagonistas de la seflalizaciOn de IL-I 7F para reducir la inflamaeiOn
[0151] En un aspecto, el invento presenta un inØtodo para disminuir una respuesta inflamatoria, pot ejemplo, la provocada per la sefializaciOn de IL-21. El mØtodo puede comprender poner on contacto una poblacion de cØlulas con un antagonista de la sefialización de IL- i 7F (pot ejemplo, polinucleOtidos inhibidores de IL-i 7F, IL- i 7R o IL-17RC; polipØptidos solubles de IL-17R o IL-17RC y sus fragmentos o sus proteinas

de fusion; anticuerpos inhibidores anti-IL-17F, anti-IL-17R o IL- 17RC; o molØculas pequefias antagonistas, etc.) en cantidad suficiente come para inhibit la actividad de IL- i 7F de Ia cØlula o poblaeiOn. Los antagonistas de la sefialización de IL- i 7F tambiØn pueden administrarse a sujetos para quienes se desea inhibit la seftallzaciOn de IL-17F (o de IL-21). Estas afecciones incluye, entre otras, trastornos infiamatorios, per ejemplo, enfermedades autoinmunes (artritis, artritis reumatoidea, psoriasis, lupus eritematoso sistØmico, escierosis mi’fltip1e), enfermedades respiratorias (EPOC, fibrosis quistica, asma, alergia), rechazo de t$splantes (incluso rechazo de trasplantes de ó rganos sOlidos) y enfermedades infiamatorias intestinales (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn).

[01521 Estos rnótodos se basan, al meno,s en parte, on el ballazgo de que la interferencia con]a seflalizaeiOn de IL- 17F, por ejemplo usando un anticuerpo de interferencia anti-IL-i 7F, disminuye las respuestas inflamatorias asociadas con IL-i 7F, per ejemplo, la producciOn de citocina per los sinoviocitos de tipo fibroblastos priinarios (Ejeniplo 4.2). Por consiguiente, pueden usarse antagonistas de la sefializaciOn de IL- 17F, es decir, molØculas que inhiban la actividad dc IL-17F (pot ejemplo anticuerpos anti-IL-17F) para reducir la inilamación in vivo, pôr ejemplo para ci tratamiento o prevenciOn de trastornos relacionados con la seflalización de IL- i’iF o de trastornos relacionados con la seflalizaciOn de IL-21.

101531 Los mØtodos para usar antagonistas de la seftalizaciOn de Ib-17F tarnbiØn pueden usarse para inhibir la actividad inflamatoria de IL-17F y, per consiguiente, pueden usarse para el tratamiento o prevenciOn de una variedad de trastornos inmunes. Entre los ejemplos de trastornos que pueden tratarse o prevenirse se cuentan ci rechazo de trasplantes, enfermedades autoinmunes, incluso per ejemplo diabetes mellitus, artritis, artritis reumatoidea, artritis reumatoidea juvenil, osteoartritis, artritis psorisica, artritis reactiva, escierosis mtltiple, encefalomielitis, miastenia grave, lupus eritematoso sistØmico (LES), tiroiditis autoinmune, dermatitis, incluso dermatitis atOpica y dermatitis eccematosa), sindrome de Reiter, psoriasis, sindrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, tilcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, colitis ulcerosa, epondiloartropatIa, espondilitis anquilosante, asma intrInseca, asma alØrgica, lupus

eritematoso cutÆneo, escieroderma, vaginitis, proctitis, erupciones farmacológicas, reacciones de reversion de lepra, eritema nudoso leproso, uveltis autoinmune, encefalomielitis alØrgica, encefalopatla hemorrÆgica necrosante aguda, sordera neurosensorial progresiva bilateral idiopÆtica, anemia aplÆstiea, anemia eritrocitica pura, trombocitopenia idiopÆtica, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis activa crónica, sIndrome de Stevens-Johnson, esprue idiopÆtieo, liquen piano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveItis posterior yfibrosis puimonar intersticial, enfermedad de injertc contra huØsped, exacerbaciOn pulmonar (por ejemplo, causada por infecciOn bacteriana) y alergia, como la alergia atópica. Los trastornos preferidos que pueden tratare usando mØtodos que comprenden la administración de antagonistas de la seflaiizaciOn de IL-17F, por ejemplo un anticuerpo inhibidor de IL-17F, incluyen entre otros, trastornos inflamatorios tales como las enfeniiedades autoininunes (por ejemplo, Ortritis, art’ritis reumatoidea, psoriasis, lupus ertemat9so sistØmico, escierosis miiltiple, enfermedades respiratorias (por ejemplo, EPOC, fibrosis quistica, asma, alergia), iechiazo de trasplante (incluso rechazo de trasplante de organo sólido) y enfermeda1es inflamatorias intestinales (por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn).

[01541 Al utilizar antagonistas de seuializaciOn de IL-17F (por ejemplo, polinucleótidos inhibidores de IL-17F, IL-17R o IL-17RC; polipeptidos solubles de IL-17R o IL-17RC y sus fragmentos o proteinas de fusión; anticuerpos inhibidores anti-M- 17F, anti-IL- i 7R o IL-i 7RC o molØculas antagonitas pequefias, etc.), es posible modular las respuestas inmunes de diversas maneras. La reducción de las inismas puede lograrse at inhibir o bloquear una respuesta inflainatoria que ya se enuentra en progreso o puede implicar la prevención de la inducciOn de uta respuesta inflamatoria.

LOiSS] En una realización, los antagonistas de la sefializaciOn de 11,17F, incluso sus composiciones farmacØuticas, se administran en tratamiento combinado, es decir, combinados con otros agentes; por ejemplo, agentes terapØuticos ütiles para ci tratamiento de afecciones o trastornos patolOgicos, tales como trastornos inmunes y enfermedades inflamatorias. El tØrmino "en combinaciOn" en este contexto significa que los agentes se administran on forma sustancialmente conteinporÆnea, sea simultÆnea

- 67 -

o secuencialmente. Si se administran secuencialmente, al eomenzar la administración del segundo compuesto ci primero de los dos coinpuestos preferiblemente puede detectarse todavia en concentraciones eficaces on el sitio de tratamiento.

[01561 Por ejemplo, la terapia combinada puede uno o mÆs antagonistas de la seæalización de IL, 17F (pot ejemplo, polinucleótidos inhibidores de IL-17F, IL, 17R o [L-17RC, polipØptidos solubles de IL-17R o IL-17RC y sus fragmentos o proteinas de fusion; anticuerpos inhibidores an6IL-17F, anti-IL-17R o IL-17RC anticuerpos; o molØculas antagonistas pequefias, etc.) coformulados o coadministrados con uno o mÆs agentes terapØuticos adicionales, por ejenplo, uno o mÆsagentes inhibidores de citocina y de factor de crecimiento, inmwiosupresivos, antiinflamatorios, inhibidores metabólicos, inhibidores enzimÆticos o agentes citotóxicos o citostÆticos, como se describen mÆs adelante. AdemÆs, unoo tnds antagonistas de la sefializaciOn de IL- 17F descritos en este documento pueden set usados on combinación con dos o mÆs de los agentes terapØutioos tambiØn descritos este documento. Tales terapias combinadas pueden utilizar ventajosamente posokgias menores de los agentes terapØuticos administrados, evitando asI posible tcixicidad o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias. AdemÆs, los agentes terapØuticos presentados en este documento actCian sobre]as vIas que difieren de la, via de sefializaciOn de receptores de IL-17F y pot consiguiente se espera que mejoren o acthen sinØrgicamente con los efectos de los antagonistas de la seflalización de IL- 17F.

[01571 Los agentes terapØuticos preferidos usados en combinaciOn con un antagonista de la, sefialización de IL- 17F son los agentes que interfieren en diferentes etapas de una respuesta inflamatoria. En una realizacjdn, uno o ms antagonistas de la sefializaeión de IL-17F descritos en este documento, pueden ser coformulados o coadministrados con uno o mÆs agentes adicionas, tales como antagonistas de citocina o de factor de crecimiento (pot ejemplo, receptores solubles, inhibidores de pØptidos, molóculas pequeflas, fUsiones de ligandos); o anticuerpos o fragmentos de union a antIgeno, que se conjugan con otros blancos (pot ejemplo anticuerpos que se conjugan con otras citocinas o factores de crecimiento, sus receptores ii otras molØculas de la superficie celular) y citocinas antiinflamatorias o sus agonistas. Entre los ejemplos de agentes que

MM

usarse en combinación con los antagonistas de la sefialización de 1L -17F
en este documento se cuentan antagonistas de una o mÆs interleucinaso de sus receptores, par ejemplo antagonistas de IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21 y IL-22; antagonistas do citocinas o factores de crecimiento o sus receptores, tales coma el factor de necrosis tumoral (TN?), LT, EMAP-H, GM-CSF, FGF y PDGF. Los antagonistas do la seflalización do IL -17F tambiØn puedon combinarse con inhibidores de anticuerpos contra molØculas do superficie celular tales coma CD2, CD3, CD4, CD8, CD20 (pot ejemplo el inhibidor do CD20 rituxinia1 (RITUXANfi)), CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (87.1), CD86 (87.2), CD90 o sus ligandos, entre ellos CD154 (g39 o CD40L) o LFA-1IICAM-1 y VLA-4/VCAM- 1 (Yusuf-Makagiausar et al. (2002) Med. Res. Rev. 22:146-67). Los antagonistas preferidos que pueden usarse en combinación con antagonistas do seialización do IL -17F descritos en este documento, incluyen antagonistas de EL-1, 1L-12, TNFa, IL-15, IL-18 yrL-22.

[0158] Los ejemplos do estos agentes icIuyen antagonistas de IL-12, tales coma anticuerpos quimØricos, humanizados, hunanos a generados in vitro (o sus fragmentos de union a antigeno) quo so lIgan a IL- 12 (j,referiblemente IL- 12 humana), por ejemplo, el anticuerpo presentado en WO 00I5672; inbibidores de receptor de XL- 12, par ejemplo, anticuerpos contra el receptor do IL-12 humana; y fragmentos solubles del receptor do IL- 12, por ejemplo, receptor do H,12 humana. Entre los ejemplos do antagonistas de IL- 15 se incluyen anticuerpos (o sus fragmentos do union do antIgenos) anti-IL- 15 o su receptor, par ejemplo, antiuerpos quimØricos, humanizados, humanos o generados in vitro de IL- 15 huniana o su receptor, fragmentos solubles del receptor do IL-IS y protemnas de union a IL-15. Entre los ejemplos de antagonistas do IL-18 so incluyen anticuerpos quimØricos, humanizados, humanos a generados in vitro (a sus fragmentos do uniOn a antigeno) anti-IL-18 humana, fragmentos solubles de receptor de IL-18 y protemnas do uniOn a IL-18 IL-18BP). Entre los ejemplos de antagonistas de IL-1 se incluyen inhibidores de enzima convertidora de Interleucina- 1 (Ed), como Vx740, antagonistas de IL-I, par ejemplo, IL-iRA (anikinra, KINERET, Amgen), sIL1RII (Immunex) y anticuerpos anti-receptor de IL-i (a sus fragmentos de uniOn a antigeno).

[0159] Entre los ejemplos do antagonistas de FNT se ineluyen anticuerpos quimØricos, humanizados, humanos o generados in vitro (o sus fragmentos de uniOn a antigeno) do FNT (por ejemplo, FNTa humano), como (HUMIRA, D2E7, anticuerpos contra FNTa humano), CDP- 57 l/CDP-870/BAY- 10-3356 (anticuerpos anti-FNTa humanizado; CelltechlPharrnacia), cA2 (anticuerpo quimØrico anti-FNTa; REMICADE, Centocor); fragmentos de anticuerpos anti-FNT (por ejemplo, CPD870); fragmentos solubles de los receptores do FNT, por ejemplo, receptores p55 op75 do FNT humano o sus derivados, por ejemplo, 75 kdTNFR-IgG (receptor do FNT de 75 kD -proteina do fusiOn de IgG, ENBRELTh; Inimunex), p55 kdTNFR-JG (receptor do FNT do 55 kD-proteina de fusion do IgG LENERCEP1); antagonistas de enzima, por ejemplo, inhibidores do enzima convertidora de FNTa (TACE) or ejemplo, un derivado del Æcidoalfa-sulfonil hidroxÆmioo e iithibidor do N-hidroxiformamida TACE GW 3333, -005 -022); y TNF-bp/s-TNFR (proteina soluble de iniOn a FNT). Los antagonistas preferidos de FNT son fragmentos solubles do los receptores de FNT, por ejemplo, receptores p55 p75 do FNT humano o sus dorivados, por ejemplo, 75 kdTNFR-IgG, e inhibidores de enzima convertidora de FNTa (TACE).

[0160] En otras realizaciones, los antagonistas de la sefializaciOn de IL- 17F descritos en este documeuto pueden administrarse en combivaciOn con uno o mÆs dolos siguientes antagonistas do L- 13, por ejemplo, receptores solubles do IL- 13 (sIL- 13) o anticuerpos para IL-13; antagonistas do IL-2, por ejemplo, DAB 486-1L-2 a DAB 389-IL-2 (proteinas do fusion de IL-2, Seragen) o anticuerpos para IL-2R, pot ejemplo anti-Tac (anti-IL-2R bumanizado, Protein Design Labs). Otra oombinaciOn adicional incluye antagonistas de sefialización de IL- 17F (por ejemplo, polinucleOtidos inhibidores de IL- 17F, IL- 17R o IL- 17RC; polipØptidos solubles de IL- 17R o IL- 17RC (incluso sus fragmentos o sus proteinas de fusiOn); anticuerpos inhibidores anti-IL- 17F, anti-IL- 17k o IL- 17RC; o molØculas antagonistas pequeflas, etc), molØculas antagonistas pequefias o anticuerpos inhibidores on combinaciOn con inhibidores no agotadores anti-CD4 (IDEC-CE9.i/SB 210396; anticuerpo anti-CD4 primatizado no agotador; IDEC/SmithKline). Otras combinaciones preferidas incluyen antagonistas do via coestimulatoria CD80 (B7.1) 6 CD86 (B7.2), incluso anticuerpos, receptores solubles o ligandos antagonistas; asi coino ligandos do glicoprotelna p-selectina (LOPS), citocinas

- 70 -

antiinflamatorias, por ejemplo, IL-4 (DNAXlSchering); IL-1O (SCH 52000; IL, 10 recombinante DNAXlSehering); IL, 13 y TGF-(3 y sus agonistas (por ejemplo, anticuerpos agonistas).

[01611 En otras realizaciones, uno o mÆs de losantagonistas de seulalización de IL-17F pueden ser coforinulados o coathninistrado eon uno o mÆsfÆrmacos antiinflamatorios, inmunosupresivos o inhibidores metabólicos o enzimÆticos. Entre los ejemplos de fÆrmacos. o inhibidores quo pueden usare on eombinación con los antagonistas de seflalización de IL-i 7F (por ejemplo, poliiuc1e6tidos inhibidores de IL- i 7F, IL- i 7R o IL- i 7RC, polipØptidos solubles de IL- 17. o IL- i 7RC (incluso sus fragmentos o sus protemnas de fusion); anticuerpos inhibidôres antilL-17F, anti-IL-17R o IL-17RC; o molØculas antagonistas pequeuias, etc) decritos en este documento se incluyen uno o mÆsde los fÆrmacos antiinflamatorios no esteroides (FAINE) por ejemplo, ibuprofeno, tenidap, naproxeno, meloxicam, piroxicai1, diclofenaco e indometacina, sulfasalacina; corticoesteroides como prednisolona, frmacos antiinflamatorios supresores de la citocina (FAISC); inhibidores do la biosthtesis do nucleótidos, por ejemplo, inhibidores de la biosintesis do purina, antagonistas 4e folato (por ejemplo, metotrexato (ÆcidoN-{4-[[(2,4-diamino-6-pteridinil) metil] metilaminoj bemzoIlj-L.-glutÆmico); e inhibidores do la biosintesis de pirimidina, por ejemplo, inhibidores de la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH). Los agertes terapØuticos preferidos para usar on eombinación con los antagonistas de se0a1ización de IL- 17F incluyen FAINE, FAISC, inhibidores de (DHODH) (por ejemplo, leflunomida) y antagonistas de folato (por ejemplo, metotrexato).
[0162] Entre los ejemplos do inhibidores adicionales se incluyen uno o mÆs de los siguientes: corticoesteroides (orales, de inhalación y do inyecciOn local); inmunosupresivos, por ejemplo, ciclosporina, tacrolimus (FK-506); e inhibidores de TORni, por ejemplo, sirolimus (rapamicina - R.APAMUNETh o derivados de rapamicina, por ejemplo, derivados solubles de rapamicina; por ejemplo, derivados de rapamicina ester como CCI-779); agentes quo interfieren con la seflalización pot citocinas proinflamatorias, tales como FNTa o IL-i (pot ejemplo inhibidores de la cinasa IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP); inhibidores do COX2, POT ejemplo, celecoxib,

- 71- 71

y sus variantes; inhibidores do la fosfodiesterasa, par ejemplo, R973401
de la, fosfodiesterasa Tipo IV); inhibidores do la fosfolipasa, par ejemplo,
do la fosfolipasa citosólica 2 (cPLA2) (par ejemplo, anÆlogos do la trifluorometilcetona); inhibidores del factor de crecimionto do cØlulas endotelialos vaseulares o de receptores del factor do crecimiento, par ejemplo, inhibidor do VEUF o inhibidor do VEGF-R e inhibidores do la angiogenia. Los agentes terapØuticos preferidos para usar en combinación con los antagonistas de la seflali.zación de IL- i 7F (par ejemplo, polinucleótidos inhibidores 4e IL-17F, IL-17R o IL-i 7RC; polipØptidos do IL-17R o IL-i7RC solubles (incluso sus fragmentos o sus proteinas de fusion); auticuerpos inhibidores anti-IL-17F, anti-IL-17R o IL-i 7RC; o molØculas antagonistas pequefias, etc.) son los inrnunosupresivos, par ejemplo, cielosporina, tacrolimus (FK-506); inhibidores do TORm, par ejemplo, sirolimus rapamicina o derivados do rapamicina, par ejemplo, derivados solubles de rapamicina (par ejemplo, derivados de rapaniicina ester, par ejemplo, CCI-779); inliibidores do COX2, par ejemplo, celecoxib y sus variantes; e inhibidores de la fosfolipasa, par ejemplo, inhibidores do la fosfolipasa oitosólica 2 (cPLA2), par ejemplo, analogos de la trifluoronietilcetona. [0163] Entre los ejemplos adicionales de agentes terapØuticos que pueden combinarse con un antagonista do la seitalización de IL-17F se incluyen uno o mÆs do: 6-mercaptopurinas (6-MP); azatioprina sulfasalacina; mesalacina; olsalacina cloroquinal hidroxicloroquina (PLAQUEN]Lfi); penicilaniina; aurotiornalato (intramuscular y oral); azatioprina; colebicina; agonistas do receptores beta-2 adrenØrgicos (salbutamol, terbutalina, salmeteral); xantinas (teofilina, aniinofihina); cromoglicato; nedocromul; ketotifeno; ipratropium y oxitropium; niicofnolato mofetilico; agonistas de adenosina; agentes axititrombOticos; inhibidores del complernento y agentes adrenØrgicos.

[0164] El uso de los antagonistas do la seuialización de IL-17F presentados on este documento en combinación con otros agentes terapØuticos para el tratamiento o prevenciOn de trastornos especiflcos relacionados con la seæalización de L- 17F so examina on mÆs detalie mÆsadelante.

[0165] Entre los ejemplos do agentes para el tratatniento o prevenciOn do trastornos artriticos (par ejemplo, artritis reumatoidea, artritis inflamatoria, artritis reumatoidea

- 72 -

juvenil, osteoartritis y artritis psoriÆsia) con los cuales se pueden combinar los antagonistas de la seflalización de 1L 17F, se incluyen uno o mÆs de los siguientes: antagonistas de IL-12 que se describen en este documento; FAJNB, FAISC; FNT, por ejemplo, FNTa, antagonistas que se desriben en este documento; anticuerpos no agotantes anti-CD4 que se describen en este documento; antagonistas dc IL-2 que se describen en este documento; citocinas aniinflamatorias, por ejemplo IL-4, IL-10, IL-13 y TGFa o sus agonistas; antagonista de IL-1 o de rec eptores de IL-1 que se describen en este documento; inhibidores de la fosfodiesterasa se describen en este documento; inhibidores de Cox-2 que se describen en este documento; iloprost: metotrexato; talidoinida y fÆrmacos rellcionados con la talidomida (por ejemplo, Celgen); leflunomida; inhibidor de la actjvación de plasminógeno, por ejemplo, Æcido tranexÆmico; inhibidor de la citocina,’ por ejemplo, T-614; prostaglandina El; azatioprina; un inhibidor de la enzima cnvertidora de interleucina-1 (ECI); zap-70 o inhibidor de ick (inhibidor de tirosina cit asa zap-70 o Ick); un inhibidor del factor de crecimiento de cØlulas endoteliales vasctlares o del receptor del factor de crecimiento de cØlulas endoteliales vasculares segün se describe en este documento; un inhibidor de la angiogenia segn se describe en ’este documento; fÆnnacos antiinflamatorios corticoesteroides (por ejemplo, SB20350); inhibidores de la FNT-convertasa; IL-11; IL-13; inhibidores de M-17; oro; penicilamina; cloroquina; hidroxicloroquina; cloranibucilo; ciclofosfamida; ciclosporina; irradiación linfoide total; globulina antitimocitica; toxinas CD5; pØptidos y bolÆgeno administrados porvia oral; lobenzarit disódico; agentes reguladores de la citocina (ARC) HP228 y HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); fosforotioato de oligodesoxinucleótidos antisentido ICAM- I (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor 1 de complemento soluble (TP 10; T Cell Sciences, Inc.); prednisona; orgoteina; polisulfato glucosaminoglicanos; minociclina (M1NOCIN); anticuerpos anti-I1,2R; lipidos marinos y botÆnicos (Æcidos grasos de semullas vegetales y pescado); auranofina; fenilbutazona; Æcido meclofenÆmico; Æcido flufenÆmico; globulinaimmune intravenosa; zileutón; deido micofenólico (RS -61443); tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamicina); amiprilosa (terafectina); cladribina (2-clorodesoxiadenosina); y azaribina. Las combinaciones preferidas incluyen uno o mÆs antagonistas de la sefialización de IL-17F (por ejemplo,

JCO

- 73 -

polinucleótidos inhibidores de IL-17F, IL-17R o 1L-17RC; polipØptidos solubles de IL- 17R o IL- i 7RC (incluso sus fragmentos o sus protelnas do anticuerpos
inhibidores anti-IL-17F, anti-IL-17R o 1L 1 7RC; o molØculas antagonistas pequefias,
etc.) en combinación con metotrexato o leflunomida y, en cases do artritis reuniatoidea
moderada a severa, ciclosporina.

[01661 Los ejemplos preferidos de inhibidores para usar on combinación con
antagonistas de la seflalización do IL- i 7F para tratar trastornos artrfticos incluyen
, antagonistas de FNT (per ejemplo, anticuerpos quimØricos, humanizados, humanos o genorados in vitro, o sus fragmentos 4e union a antigonos, que se ligan a FNT;
fragmentos solubles de un receptor do FNT, per ejemplo, receptor p55 o p75 do FNT
humane o sus derivados, per ejemplo, 75 kdTNFR-IgG (receptor de 75 kD de FNT-
proteina do fusion IgG, ENBRELTh), receptor p55 kD do FNT -proteina do fusiOn IgG;
antagonistas do enzima do FNT; per ejemplo inhibidores do enzhna convertidora do
FNT(x (TACE)), antagonistas de IL-12, IL-15, IL-18, IL-22; agentes agotadores do cØlulas T y B (por ejemplo, anticuerpos anti-CD4 o anti-CD22); inhibidores do moiØculas pequeuias, per ejemplo, metotrexato y leflunomida; sirolimus (rapamicina) y sus anÆlogos, per ejemplo, CCI-779; inhibidores do cox-2 y cPLA2; PAINE; inhibidores do p38, inhibidores do TPL-2, Mk-2 y NFkb; RAGE o RAGE soluble; inhibidores de P-selectina o PSGL- 1 (Per ejemplo, irthibidores do molØculas pequeflas, sus anticuerpos, per ejemplo, anticuerpos, contra P-selectina); agonistas do receptor do ostrógeno beta (REB) o antagonistas de REB-NFkb. Los agentes terapØuthos adicionales mÆspreferidos, quo puoden coadministrarse o coformularse con uno o mÆs antagonistas de la sefIalizaciOn de IL-17F (per ejemplo, polinueleOtidos inhibidores do IL-17F, IL-17R o 1L-17RC; polipØptidos solubles do IL-17R o IL-17RC (incluso sus fragmentos o sus protelnas de fusiOn); anticuerpos inhibidores anti-IL-17F, anti-IL- 17R o IL-17RC; o molØculas antagonistas pequeflas, etc.) inciuyen uno o mÆs do los siguientes: un fragmento soluble de un receptor de FNT, per ejemplo, receptor p55 o p75 de FNT humane o sus derivados, per ejemplo, 75 kdTNFR-IgG (receptor 75 kD do FNT -proteina do fusion de IgG, ENBREL’); mototrexato, leflunomida o un sirolimus (rapamicina) 0 Un anÆlogo delos niismos, per ejemplo, CCI-779.

- 74::-

1671 Entre los ejemplos de agentes para el trataniiento o la prevención.de la sclerosis multiple con los cuales se pueden combinar antagonistas de la sealización de
- 17F se incluyen los siguientes: interferónes, por ejemplo interferon alfa- la (por jemplo, AVONEXTtM; Biogen) e interferOn- lb (BBTASERONTM ChironlBerlex); opolImero 1 (Cop-1; COPAXONETM Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxigeno iperbÆrico; inmunoglobulina intravenosa; cladribina, antagonistas de FNT que se describen en este documento; corticoesteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; ciQiosporina A, metotrexato; 4-aninopiridina; y tizanidina. Entre los antagonistas adicionles que pueden usarse en combinaciOn con antagonistas de la sefializaciOn do IL- 17F s incluyen anticuerpos contra o antagonistas do otras citocirias o factores de crecimiento humanos, por ejemplo, FNT, LT, IL- 1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL- 12 IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-li, GM-CSF, FGF y PDGF. Los antagonistas do la sefializaciOn de IL- 17F quo se describen en este documento pueden combinarse con anticuerpos contra las molØculas do la superficie celular, como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o sus ligandos. Los antagonistas de la seflalizaci6n do IL- 17F tambiØn pueden combinarse con agentes como metotrexato, ciclosporina, K506, rapamicina, micofenolato mofetilico, leflunomida, PAINE, por ejemplo, ibuproeno, corticoesteroides tal como prednisolona, inhibidores do la fosfodiesterasa, agonitas de adenosina, agentes antitrombOticos, inhibidores do complemento, agentes alrenergicos, agentes que interfieren con la seflalización do citocinas proinflamatorias quo se describen en este documento, inhibidores do la enzima convertidora del IL-lb (pot ejemplo, Vx740), anti-P7s, PSOL, inhibidores de TACE, inhibidores do la sefializaciOn de cØlulas T, tales como inhibidores do la cinasa, inhibidores do inetaloproteinasa, sulfasalacina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores do enzima convertidora de angiotensina, receptores de citocina soluble y sus derivados, segn se describe en este documento, y eitoinas antiinflamatorIas (pot ejemplo IL-4, IL- 10, IL- 13 y TOF).

[01681 Entre los ejemplos preferidos de agentes terapØuticos para eselerosis multiple, con los cuales pueden combinarse los antagonistas do la fializaciOn de IL- i 7F se incluyen interferon-B, por ejemplo, WNL-1a e 1FNI3-1b; copaxona, corticoesteroides,

.10

- 751- 5-

doe IL- I, inhibidores de FNT, anticuerpos contra ligando CD40 y CD80,
de IL-12.

691 Entre los ejemplos de agentes para el tratamiento o prevención de una Łrmedadinflamatoria intestinal (por ejemplo, enfemiedad de Crohn, colitis ulcerosa) on los cuales se puede coinbinar un antagonista de la sefialización de IL-17F (por jemplo, polinucleOtidos inhibidores de 11,17F, IL-17R o IL-i 7RC; polipØptidos olubles de IL-17R o IL- 17RC (incluso sus fragmentos y sus proteinas de fusion); nticuerpos inhibidores anti-IL-17F, anti-IL- 17R o IL- i7RC; o molØculas antagonistas equeæas, etc) se incluyen los siguientes: budenósido; factor de crecimiento epidØrmico; corticoesteroides; ciclosporina; sulfasalacina; aminosalicilatos; 6-. mercaptopurina; azatioprina, metronidazol; inhibidores de la lipoxigenasa; niesalamina; olsalacina; baisalacida; antioxidantes; inhibidores de tromboxano; antagonistas del receptor de IL-i; anticuerpos monoc1onale anti-IL-I; anticuerpos monoclonales anti-IL-6; factores de crecimiento; inhibidores de la elastasa; compuestos de piridinil-imidazol; antagonistas de FNT quo se describen en este documento; citocinas de IL-4, 11,1 0, IL-13 o TGFI3 o sus agonistas (por ejemplo, anticuerpos agonistas); IL-11; profÆrmacosde prednisolona, dexametasona o budesOniclo conjugados eon glucurOnido o dextrÆn; oligodesoxinucleOtidos de fosfoEotioato antisentido ICAM- 1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor I de coniplemento soluble (TPIO; T Cell Sciences, Inc.); mesalacina de liberaciOn lenta; metotrexato; antagonistas del factor activante de plaquetas (FAP); ciprofloxacina y Iignocaiiaa.

E01701 En una realización, un antagonista de la sefialización de IL-17F (por ejemplo, polinueleótidos inhibidores de IL-1717, It-17R o IL-17RC; polipØptidos solubles de IL-17R o IL- 17RC (incluso sus fragmentos o sus protemnas de fusion); anticuerpos inhibidores anti-IL-17F, anti-IL-17R o IL-17RC; o molØculas antagonistas equeflas, etc.) puede usarse en combinación con uno o ma’s anticuerpos dirigidos a otros blancos implicados en la regulaciOn de respuestas inniunes, por ejemplo, el rechazo de trasplantes. Entre los ejemplos de agentes para el tratamiento o la prevención de respuestas imnunes con los cuales puede combinarse tin antagonista de La sefializaciOn de IL- 17F se incluyen los siguientes: anticuerpos contra otras molØculas de La superficie

- 76-

elular que incluyen, entre otros, CD25 (receptor-a de iuterleucina-2), CD la (LFA- 1), D54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4 (CD80 (B7. 1), por ejemplo, CTLA4 Ig batacept (ORENCIAfi)), ICOSL, ICOS o CD86 (B7.2). En otra realización adicional, antagonista de la sefialización de IL - 17

:

F se usa en cornbinación con uno o tnâs

agentes inmunosupresivos, tales como ciclosorina A o FK506.
101711 En otras realizaciones, los antagoiiistas de la sefialización de IL-17F (por ejemplo, polinucleótidos inhibidores de U--17F, IL-17R o IL-17RC; polipØptidos solubles de IL-17R o IL- I7RC (incluso sus fragmentos o sis proteinas de thsión); anticuerpos inhibidores anti-JL-17F, anti-IL-17R o IL-17RC; o molØculas antagonistas pequefias, etc.) se usan como adyuvantes para vacunas contra trastornos autoinmunes, enfermedades inflamatorias, etc. La combiiación de adyuvantes para el tratamiento de estos tipos de trastornos es adecuada para tisar en conjunto con una aniplia variedad de antigenos de autoantigenos blanco que pirticipan en la autoinniunidad, por ejemplo, protelna bÆsica de mielina; autoantigenos inflamatorios, pot ejemplo, proteina pØptida amuloide o antigenos de trasplante, por ejemplo aloantigenos. El antIgeno puede comprender pØptidos o polipØptidos deritados de protelnas, asI como fragmentos de cualquiera de los siguientes: sacÆridos, protelnas, polinucleótidos u oligonucleOtidos, autoantigenos, protelna de pØptido ami1ode, antigenos de trasplante, alergenos u otros componentes rnacromoleculares. En aiguitos casos, se incluye mÆsde un antIgeno en la coniposición antigØnica.
[0172] Pot ejemplo, las vacunas deseabjes para tnoderar las respuestas a alergenos en un anfitrión vertebrado, que contienen las combinaciones adyuvantes de este invento, incluyen las que contienen un alergeno o fragmentos del inismo. En la, Patente de EE.UU. No 5.830.877 se describen ejemplos de dichos alergenos y se han publicado en la Solicitud de Patente Intemacional No. WO 99/51259 (incorporadas aqul en su totalidad come referencia) e incluyen polen, veneno de insectos, caspa de animales, esporas fungales y fÆrmacos (come la penicilina). Las vacunas interfieren con la producciôn de anticuerpos para IgE, una causa conocida de las reacciones alØrgicas. En otro ejemplo, las vacunas deseables para la, pevenci6n o el tratamiento de una enferniedad caracterizada per deposición aniiloide en un anfltrión vertebrado, que

- 77 -

contiene las combinaciones adyuvantes do este invento, ineluyen las que contienen porciones de proteina pØptida amiloid (PPA). Esta enfemiedad se denomina alternativamente como enferniedad de Alzheimer, amuloidosis o enfertnedad amuloidognica. Por consiguiente, las vacunas do este invento incluyen las combinaciones adyuvantes de este invento, ademÆsde pØptido A13, asi como fragmentos del pØptido AP y anticuerpos contra el pØpido A3 o sus fragmentos.

[0173] Los mØtodos para 1) disminuir lafunción celular quo presenta antIgeno y 2) la terapia combinada para el control do la inmunosupresión son muy conocidos (ver, par ejemplo, Xiao et al. (2003) BioDrugs 17:10341; Kuwana (2002) Hum. Immunol. 63:1156-63; Lu et al. (2002) Transplantation 73:S19-S22; Rifle et al. (2002) Transplantation 73:Sl-S2; Mancini et al. (2004) Crit. Care. Nurs. Q. 27:61-64).

[0174] Otro aspecto del presente invento tiene que ver con los kits para lievar a cabo la administración do antagonistas de la seflalización do IL-17F (por ejemplo, polinucleôtidos inhibidores de IL -17F, IL-17R o IL-17RC; polipØptidos solubles de]L-17R o]L-17RC (incluso sus fragmentos o sus proteinas do fusion); anticuerpos inhibidores anti-IL-17F, anti-IL-17R o IL-17RC; o molØculas antagonistas pequefias, etc.) con otros compuestos terapØutico& En una realización, el kit contiene uno a mÆs agentes de union fonnulados en un portador farmacØutico y al menos un agente, por ejemplo un agente terapØutico, forinulado adecuadamente en una o mÆs preparaciones farmacØuticas distintas.

[01751 El contenido completo do todas las referencias, patentes y solicitudes do patentes publicadas citadas a lo largo de esta solicitud so incorporan en este documento como referencia.

EEMPLOS

101761 Los siguientes ejemplos proporcionan realizaciones ilustrativas del invento y de ninguna manera limitan su alcance, thia persona con conocimientos bÆsicos do esta tecnologIa reconocerÆ que hay muchas otras realizaciones comprendidas dentro del alcance del invento.

- 78- 7

[01771 Los ejemplos no incluyen descripciones detalladas de mØtodos convencionales, tales como los mØtodos empleados en la construcci6n de vectores, la inserción de genes codificadores de polipØptidos dentro de dichos vectores y plÆsrnidos,la introducción de dichos vectores y plÆsinidos enlas cØlulas anfltrionas, y la expresión de los polipØptidos a partir de tales vectores y plÆsinidos eu las cØlulas anfltrionas. Estos mØtodos son conocidos por los expertos en esta teenologla.

Ejemplo 1: Respuestas inflamatorias mdiadas por IL-17F y consecuencias para los trastornos inflamatorios, por ejemplo, arthtis reumatoidea, trastornos respiratorios inflamatorios y enfennedad inflamatoria intestinal.
Ejemplo 1.1: La administración de IL-iIF humana a ratones no expuestos previamente induce un influjo de neutrófllos dentro dl peritoneo.
[0178] La observación de que el tratamiento con IL-.17F causa un aumento en la descomposición de proteoglicanos y UflL reducciOn en la sintesis de proteoglicanos por parte del cartilago articular (Hyinowitz al. (2001) E1v[BO J. 20:5332-41) sugiere que la safializaci6n de IL-17F desempefta un papel en el desarrollo de las enfermedades inflamatorias del tejido articular. En! efecto, las muestras de liquido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea y osteóartritis muestran degradación de proteoglicanos, incluso por ejemplo, de agrecano, queratina y colÆgeno (ver, por ejemplo, Witter et al. (1987) Arth. Rheum. 30:519-29 y Yagi et al. (2005) J. Orthop. Res. 23(5):1128-38), y los modelos de artritis in vitro imitan este fenómeno al exhibir la degradación de proteoglicanos y la matriz (Neidhart et al. (2000) Arth. Rheum. 43:1719-28).

101791 AdemÆs, ci aumento en la expresiOn de IL-17F observada en muestras de LBA aisladas de pacientes con asma (Kawaguchi et al. (2002)J. Immunol. 167:4430-35) y las muestras de colon aisladas de pacientes con enferrnedades inflamatorias intestinales, por ejemplo, colitis ulcerosa o enfermedad dc Crohn (Gurney et al. (2003) GTCBIO Conference: Cytokines y Beyond) sugieren un papel adicional para la seflaiización de IL-17F en los trastornos inflamatorios pulmonares y de.tejidos intestinales. Con el objetivo de investigar el papel que desempefla la seialización de IL-17F en las respuestas inflamatorias, se inyectaron ratones no expuestos previamente usando PBS intraperitonealmente (como testigos) o con 100 tg de IL-17F humana (ID DE SEC N°

0

- 79-

2),. Horas despuØs del tratamiento se tomaron muestras do sangre perifØrica (SP; 1, 2, 4,

111y

10 h) do cavidades peritoneales (CAPE; 2, 4, 6, 8 10 h) se determinó el recuento absoluto de neutrófllos (RAN) en cada muestra. Los datos de la Tabla 2 reflejan la capacidad do IL-17F para auluentar los recuentos de neutrótIlos on la sangre el peritoneo. Este efeoto puede explicar la neutrofihia observada en pacientes con
artritis reumatoidea enfermedades pulnonares obstructivas crónieas (EPOC).

Tabla 2. Recuentos absolutos de neutrófflos (R-AN; media DEM) en muestras de sangre perifØrica (SP) de la cavidad peritoneal (CAPE) obtenidas do ratones inyectados.con PBS (a 5) o 1L17F (a 5). 81 asterisco indica un valor de <0,05 en comparaciones con rnuestras testigos.

Horas despus de la SP: RAN x103/ul CAPE: RAN x105/ml
iTIyección
PBS IL-17F PBS IL-17F
1,24–0,59 1,97–0,45
2 0,15–0,10 1,01–0,25* 0,08–0,05 2,28–2,52
4 0,15–0,08 0,7–0,13* 0,00–0,01 0,30–0,15*
6 0,25–0,13 0,9–0,4* 0,04–0,06 2,03– 1,35*
8 0,22–0,06 0,3–0,08 0,02–0,02 1,20–2,11
10 0,11 0,09 0,48–0,36 0,02–0,03 2,06– 1,53*

Ejemplo 12: La sefialización do IL-17F desempefia un papel en los trastornos articulares inflamatorios.

[0180] Con el objetivo de evaluar md9I a fondo la participación de la seflalizaciOn do IL- i 7F en la inflamación, particularmente, las respuestas inflamatorias implicadas on las enferruedades articulases (por ejenplo, la artritis) se determinó la capacidad do
IL- I 7F para activar un factor primario participante en la transcripción do citocinas intlamatorias, es decir, NF-i.B, en condrocitos primarios. Se infectaron condrocitos humanos o porcinos primaries (100 MOl) eon adenovirus quo expresaban un sistema de genes indicadores de NF-icB quo detetan la activación de NF-iB (es decir, la translocación de NF -KB desde el citoplasma bacia el nÆcleo) midiendo la expresión de un gen de luciferasa quo es controlado por un promotor que responde a NF-icB (BD Mercury Pathway Profiling systems, BD Biosciences, Palo Alto, CA). Al cabo de 48 a 72 horas, los condrocitos infectados se cultivaron con concentraciones variables de

IL- I 7A (1D DE SEC N° 4) o IL- 17F. DespuØs de cuatro horas de incubación con
IL- 17A o IL- i 7F, las cØlulas fueron lisadas on 25 jtl de amortiguador de lisis (Promega, Madison, WI) durante 20 minutos a temperatura ambiente y se midió la activaciónde
NF-iB con un luminómetro automÆtico. Los datosmuestran que LL-17F activó NF-iB en condrocitos humanos primarios (Figura lA) y condrocitos poroinos primarios
(Figura 111) do acuerdo a la dosis. Finalmente, la cantidad de IL- 17F que se necesita
para activar NF-KB hasta alcarizar niveles superiores a los do referencia, fue similar a la Scantidadde IL- 17A que se necesita para activar NF-KB hasta alcanzar niveles superiores a los do referencia (Figura 1A)
[0181] La capacidad do IL- 17F para actiyar el factor de transcripeión de citocina, NF-icB, on los condrocitos primarios sugierŁquo el papel que desenipefla IL-17F on la inflarnación de tejido articular, por ejemplo, durante el desarrollo de artritis, implica la inducción de citocinas inflamatorias. Para probar el efecto de IL-17F sobre la
producción do citocina inflamatoria por parte de los tejidos articulares, so colocaron
sinoviocitos do tipo fibroblasto humanos, obtenidos de dos pacientes con diagnóstico de
artritis reumatoidea (AR), hasta semiconfluencia, en placas de 24 pocillos y so
cultivaron on ausencia o presencia de 150 ng/nil de IL-17F. Los materiales
sobrenadantes so recogieron a las 48 horns y se evaluó la producción do citocina usando
, un sisterna multiplex de citocina (Piercb-Bio, Rockford, IL). Como se presenta on la Figura 2, la IL-17F indujo la producciÆnde citocinas inflamatorias, tales como IL-6 e
IL-8, y quiiniocinas, tales como MCP- Ili y GRO-c, por parte do los sinoviocitos do tipo
fibroblasto humanos aislados do los pacientes con AR.

[0182] La capacidad do IL-17F para activar NF-iB en condrocitos primarios y do
inducir la producción do citocinas yquimiocinas, particularmente las quimiocinas que
participan en el reclutamiento do neutrófllos, por los sinoviocitos do tipo fibroblasto humanos en pacientes con AR, apoya el papel de la IL-17F on la mediación de respuestas jutlamatorias por parte del tejido articular. Estos datos, tornados conjuntamente con los quo demuestran un aumento de la expresión de IL-17F on las patas do ratones con artritis inducida por colÆgeno, comparados con los do animales testigos (no se presentan los datos) y la presencia do neutrófflos dentro del espacio

-8181 --

articular y el cartilago articular degenerado (no Sc presentan los datos) sugieren que la IL- i 7F es mediadora on las enfermedades inflamatorias articulares (por ejemplo, artritis
reumatoidea) al inducir la producción de citocina y quiniiocina que posteriorinente
reclutan cØlulas inrnunes al lugar de la inflamación (por ejemplo, neutrófilos) que dafian
los tejidos circundantes.

Ejemplo 1.3: Los fibroblastos pulmonares murinos primarios responden a U.,,-17F al
aumentar la producción de quixniocinas y citocinas inflamatorias.

S[01831 Con el objeto de investigar ci papel de la IL-17F en el desarrollo de las enfermedades inflamatorias respiratorias, se cultivaron cØlulas de fibroblasto pulmonar
murino (FPM) hasta semiconftuencia en placas de 24 pocillos y se trataron con IL- 17F
(50 ng/ml). Se recogió ci material sobrenÆdante a las48 horas y se evaluó la producción
de citocina con un sistema multiplex de citocina (PierceBio, Rockford, IL). La Figura
3 demuestra que la IL-17F indujo la producción cb FPM de citocinas inflamatorias,
tales como IL-6, y de quimiocinas tales come JE (CCL2) y KC. Estos resultados sugieren que la TL- 17F contribuye a las respuestas inflamatorias implicadas en los trastornos inflamatorios del pulmón (pot ejemplo, EPOC, asma, alergia, fibrosis quistica) al inducir la producción do citocinas inflamatorias y quimioatrayeiltes leucocitarios.

Ejemplo 2: Caracterización de receptore$ de IL- i 7F.
Ejemplo 2.1: La IL- 17F se liga a IL- 17R e IL-17RC.
[01841 Dado que IL- 17F comparte la mayor honiologia con IL- 17A dentro de la famulia de IL-17 y coma se ha sugerido que so sefializan la 1L-17A y la IL-17F mediante el receptor IL- 17, se determinó la capacid*d de IL- i 7F para ligarse al receptor de IL- i7A (es decir, IL- i7R 11) DE SEC N° 6). TambiØn se evaluó la capacidad de IL-i 7F para ligarse a IL- i 7RC, un receptor de IL- 17 cuyo ligando no ha sido identificado hasta el

momento.

[0185] Se incubaron placas de ELISA con 1,5.ig/m1 de IL-17R-Ig humana (ID DE SEC N° 34) 6 1,5.ig/ml de IL, 17RC-lg humana (ID DE SEC N° 35) durante la noche, Las placas se lavaron con PBS/1%I3SA y se incubaron con diluciones en serie de IL-17A conjugada con biotina o con IL-17F conjugada con biotina durante 2 horas a

- 82 -

temperatura ambiente (TA). DespuØs de lavar, se aftadieron concentraciones saturantes de avidina-biotina-peroxidasa (IIRP) y las placas se incubaron durante una hora mÆs a TA. La avidina-HRP no ligada se lavó con PBS/l% BSA y ELISA se realizó con TBM. La IL-17A o la IL-17F ligada se detectó pQr medio de la medición de absorbancia a 405

Mn.

[01861 Las Figuras 4A y 48 demuestan la union de IL-17F con IL-17R y con IL- i7RC respectivamente, donde se obseva que IL- 17F tiene una mayor afinidad pot IL- 17R que pot IL- 17RC (valor cc CF,59 para IL- 17R:IL-17F = 1,23 g/m1; valor de CE50 para IL- 17RC:IL- 17F = 15.g/ml). Sin embargo, aunque IL- 17F se IigO a IL- 171Z, su afinidad pot ci receptor fue menor que la afinidad de IL-i7A para con el mismo receptor (valores de CEo para IL-17R-,::IL-17F = 1,23 g/rnl, IL-i 7R:IL- 17A = 0,35 p.g/mI; Figura 4A).

Ejernplo 2.2: El anticuerpo anti- IL- 17R la proteina de fusiOn de IL-17RC-Ig bloquean la actividad de IL- I 7F, no asi la protelna: de fusion IL- i7R-1g.
[0187] Para describir ma’s a fondo la uniOn del receptor de IL-17F, Se estirnularon cØlulas de fibroblastos humanos (lOu cØlulas/pocillo) con 0,5 ng/ml de IL-17A o 20 ng/ml de IL- 17F en presencia de conceutraciones en aumento de una proteina de fusion de IL- 17R-1g, una proteina de fusiOn IL-17RC-Ig 0 Ufl anticuerpo anti-IL-17R. DespuØs de 24 horas, se determinaron las concentraciones de GRO-a recogidas de los materiales sobrenadantes con un niØtodo ELISA disponible comercialmente (R&D, Minneapolis, MN). Las concentraciones de GRO-x se determinaron sobre la base de una curva estÆndar,

[0188] La Figura 5 demuestra un aumento de la produciOn de GRO-c por parte de las cØlulas flbroblÆsticas humanas cuanao se incuban con 11,-I 7A (&) o IL-i 7F) y corrobora aim mÆslos hallazgos del Ejemplo 1.2 (que demuestra una mayor producciOn de citocinas inflamatorias pot parte de los sinoviocitos de lipo fibroblasto humanos, cultivados con IL-17F). La Figura 5A demuestra, ademÆs, que los tres antagonistasde receptores, es decir, IL- 17R-Ig (h17R.Fc), EL-17RC-Ig (h17RH2.Fc) y el anticuerpo anti-IL-17R (ahJL17R) bloquearon la capacidad de IL-17A para inducir GRO-a. Estos datos sugieren que la IL- 17A se une a los receptores de 1L- 17R y de IL-i7RC y necesita

’1

a ambos para seæalizar la IL- 17A. Por el contrarlo, solo ci anticuerpo anti-IL- 17R y la proteina de fusion de IL- 17RC-Ig bloquearon notabiemeute la actividad de IL-17F, no asi la proteina de fusion de IL- 17R-Ig (Figura 5). Los datos presentados en la Figura 5B sugieren que IL- i 7F se liga a IL- i 7R (ver Figura 4) pero no necesita a este receptor para la sefializaciOn mediada par IL- 17F. En conjunto, estos datos sugieren que IL- 17A e IL- 17F taT vez usen diferentes receptores para niediar an actividad sobre las cØlulas fibroblÆsticashumanas.

Ejemplo 3: Generación y caracterización i de anticuerpos anti-IL-17F.
Ejemplo 3.1: GeneraciOn de anticuerpos anti-IL- 17F.

[01891 Se inyectó a un grupo de cinco ratones (Jackson Labs, Maine) con 2 tg de ADNc codificador de IL- 17F humana. EI ADNc del piÆsmido purificado se precipitO sabre perlas doradas a una concentraciOn de 1 gg ADNc/0,5 mg oro. Se aplicaron las perlas doradas y ci ADNc precipitado mensualmente en dos inyecciones no superpuestas, de manera intradØrmica en ci abdomen de ratas 8alb/c de 11 semanas de vida, usando ci gen cargado con Heiio. §e inmunizO a estos animaTes cada cuatro semanas y se extrajeron los bazos al final de este periodo. Las re-inmunizaciones se realizaron con la protelna IL- i 7F purificada ademÆs de ADNcde IL- 17F. Los bazos se procesaron para obtener una suspensiOn de Tinfocitos y la snapensiOn resultante se fusionO con la imnea de cØlulas del mielpma 6531P3, usando 50% (w/v) de glicol de polietileno 1500 mediante un procediniento establecido (Oi y Herzenberg (1980) en Selected Methods in Cellular Immunology, Mishel y Schigi, eds. W. J. Freeman Co., San Francisco, CA, p. 351). Las cØlulas fusionadas se colocaron on placas de microtitulaciOn de 96 pocillos a una dnsidad de 2 x 105 cØlulas/poeillos y despuØs de 24 horas se sometieron a una selecciOn HAT. Las cØlulas hibridoma que secretan anticuerpos putativos anti-IL- 17F fueron identificadas por medio de la fuse sólida y de solución de ELISA. Los pocillos con el hibridoma positivo correspondiente a los anÆlisis anteriores fueron expandidos, clonadospot la diiución limitante y criopreservados. Se determinaron los isotipos de los anticuerpos usando ELISA on fase sólida. La IL- I 7F-Ig humana purificada se usO para cubrir placas de microtitulaciOn de 96 pocillos y se detectó pot media de diversas IgG de cabra anti-ratón conjugadas con

de isotipos espeefficos (Zymed, Sur de San Francisco, CA). Se agregó
tvidina conjugada con avidina-biotina-peroxidasa y so midió la enzima ligada icarnente con nn substrato colorimØtrico.

Ejemplo 3.2: Algunos anticuerpos anti-IL- 17F inhiben la union de IL, 17F con IL-17R 101901 Para evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-IL- 17F para bloquear la union de IL-17F con IL-17R, se realizaron los anÆlisis do inhibición modificando el ELISA descrito en el Ejemplo 2.1. Brevemente, las diluciones en serie de los anticuerpos anti-1L-17F so incubaron previamente con 7 gg/ml de IL-17F durante 1 hora a temperatura ambiente. Se colocaron las mezclas do ciocina-anticuerpos en pocillos separados de una placa ELISA cubierta previamente con 100.dJpocilIo de 1,5jig/ml de IL-17R-1g. La mezcla so incubO en los pocillos durantt 1 hora a temperatura ambiente. DespuØs de lavar la placa con PBS/i% BSA, se agregaron concentraciones saturantes do avidina-HRP y la placa the incubada durante una iora mÆs a temperatura ambiente. La avidina-}IRP no ligada se limpiO con PBS/1% BSA. El ensayo se desarroilO con TMB. La Figura 6 demuestra que cinco de los seis anticuerpos probados, es decir, anti-IL-17F-01, anti-IL-17F-02, anti-IL-17F-06, anti-IL-17F-07 y (aunque en un grado menor) anti-IL-17F-05 fueron capaces do bloquear la inión de IL- 17F con IL -17R. En contraste, el anticuerpo anti.-IL-17F-03 no inhibió la unón de IL-17F con IL-17R (Figura 6).

Ejeinplo 3.3: Algunos anticuerpos anti EL-17F inhiben la union de IL-17F con IL-17RC.

[0191] Para evaluar la capacidad do los anticuerpos anti-IL- 17F para bloquear la union de IL- i 7F con IL-i 7RC, los anÆlisis do inliibición que usan ELISA modificado segün lo descrito anteriormente se realizaron con placas previamente cubiertas con 1,5 tg/ml do IL-17RC-Ig e IL-17F en una concentraciOn do 20 p.g/ml. La Figura 7 deinuestra que dos de los 6 anticuerpos probados (anti-IL-17F-01 y anti-IL-17F-07) fueron capaces do inhibir la union de IL- i 7F con IL- i 7RC. En contraste, los anticuerpos anti-IL-i 7F-02, anti-IL- 17F-03, anti-IL- 17F-05 y anti-IL- 17F-06 no initibieron la union de IL- 17F con IL-17RC (Figura 7). Al tomar las Figuras 6y 7, los datos no sOlo sugieren que los anticuerpos anti-IL-17F se unen a panes especificas do IL-17F, sino tambiØn que los anticuerpos an64L-17F-02 y anti-IL- 17F-06 se unen o inhiben la union con twa parte

- 8585 --

de IL-17F espeelfica para la interacción:entre 1L-17F e IL-17R mientras que los anticuerpos anti-JL-17F-01 y anti-IL-17F-07 se mien o inhiben la union con una parte de IL-17F compartido entre IL-17R e IL-17RC. Pot consiguiente, estos seis an’ticuerpos pueden usarse para definir distintas partes, por ejemplo, epitopes, en IL, i 7K

Ejemplo 4: Los anticuerpos anti-IL-17F inliben las bioactividades de IL-17F. Ejemplo 4.1: Los anticuerpos Anti-IL-17F inhiben fa produceión de citocina mediada porlL-17F.
[01921 Para determinar si alguno de lis anticuerpos anti-IL-17F descritos on ci Ejemplo 3 inbiben la bioactividad de IL-17F, se estimularon cØlulas de fibroblasto humano (10 cØlulas/pocillo) con 20 ng/mI de IL-17F humana on presencia de concentraciones en aumento de un antiuerpo testigo (migGi) o anticuerpos para

IL-17F, es decir anti-IL-i 7F-01, anti-IL-1! 7F-02, anti-IL-17F-03, anti-IL- 17F-05, anti-IL-I 71F-06 o anti-IL-i7F-07. Luego de 24 horas, se recogiO el material sobrenadante y se determinaron las concentraciones de GIO-cL con el ensayo ELISA que se encuentra disponible comercialmente. Las concentraCiones de GRO-a producidas se determinaron sobre la base de una curva estÆndar.

101931 La Figura 8 demuestra que los anticuerpos anti-IL-17F-01, anti-IL-17F-02 y anti-IL-17F-07 inhibieron la producción de GRO-a mediada por IL -17F humana por parte de las cØlulas de fibroblasto humanb. Los resultados, presentados en las Figuras 6, 7, y 8 sugieren un modelo on ci que la seflalización de IL -17F se inicia por la uniOn de IL- i 7F con IL- i 7R, lo cual resulta en subsiguiente reclutamiento y la seflalización requerida mediante IL- i 7RC.
Ejemplo 4.2: Usos potenciales de los anticuerpos anti-IL-17F en ci tratamiento de trastornos inflamatorios.

[01941 Para determinar ci potencial de los anticuerpos anti-IL-17F, on particular el anticuerpo anti-IL-17&07, como terapØutico en el tratamiento de trastornos relacionados con la sefializaciOn de IL-17F (por ejemplo, enfermedades autoininunes, enfermedades respiratorias, enfennedades inflamatorias intestinales, etc.) se incubaron condrocitos porcinos primarios infectados con un vector indicador de NF-icB durante 48 horas con 100 ng/ml de U, 17A 6 500 ng/rnl de IL, 17F incubado previamente durante 1

J11

a teniperatura ambiente on ausencia o presencia de uno do los siguientes: 20 pg/mi
de protelna do fusiOn do IL- 17R-Ig (IL17R/Fc), 10 jtg/rn1 do anticuerpo anti-IL-17F-07 (anti-IL17F) 10.tg/ml de anticuerpo testgo (IgG de ratón). La Figura 9 demuestra quo, si bien la incubaciOn de la proteina do fusiOn IL-i 7R-Ig inhibiO la activaciOn de NF-,KB mediada por IL- i 7A, no tuvo efecto sobre la activación mediada por IL- 17F de NF-KB. En confraste, el anticuerpo anti-IL-17F-07 fue capaz de inhibir la activaciOn do NF-icB mediada por IL- i 7F, pero no tuvo efecto sobre la activación do NF --KB mediada por IL- 17A (Figura 9).

[0195] Para evaluar si la inhibición de: la activación de NF-B on presencia de. auticuerpos anti-IL-17F se correlacionaba con la inhibiciOn do la producciOn de citocina, se incubaron sinoviocitos do tipo fibroblasto humanos incubados con IL-17F segCin lo descrito on el Ejemplo 1.2 con un anticuerpo testigo de isotipo, anticuerpo anti-IL-17F-01 o anticuerpo anti-IL-17F-07. Ls concentraciones de IL-6, IL-8, o GRO-a se evaluaron segin lo descrito on el Ejenp10 1.2. La Figura 10 demuestra quo la capacidad do los anticuerpos anti-IL-1IF para inhibir la activaciOn de NF-iB por IL-17F se correlacionaba con una reducQión on la producción do LL -6 IL-8, y GRO-c por sinoviocitos de tipo fibroblasto prmario aislados de dos pacientes con artritis reumatoidea. Estos datos sugieren quo log autagonistas de la seæalizaciOn de IL-i7F quo incluyen, entre otros, a los anticuerpos inhibidores dirigidos hacia JL-17F pueden usarse para reducir las respuestas inflamatorias. En particular, los inhibidores de IL-17F pueden usarse on el trataniiento de respuestas inflamatorias asociadas con trastornos relacionados con la seflalizaciOn de 1-17F, por ejemplo, trastornos asociados con IL-17F.

Ejemplo 5: Los anticuetpos dirigidos hacia IL- 17F e IL- 17A pueden usarse para detectar y purificar homodimeros de IL- 17F recombinantes y naturales, homodimeros de IL-17A, y heterodimeros de IL- 17A!1L-17F.
Ejemplo 5.1: La detección do IL-17A/IL-17A, IL-17F/IL-17F e IL-17A/IL-17F recombinantes por ELISA.
[0196] Se usaron ADNc c9dificadores de IL-17A humana, IL-17F humana o IL-17A humana e IL-17F humana para modificar 293 cØlulas. La expresión de estos ADNes

resultó en la producción de dimeros IL-17A/IL-17A, IL-17F/IL-17F o IL-17A/]L-17F. El medio condicionado derivado de estas clu1as, es decir, las citocinas recombinantes y anticuerpos disponibles comercialmente o descritos anteriormente, se usaron para desarrollar formatos de ELISA para la detección de la proteina de IL- i 7A, proteina de IL- i7F o heterodimeros de IL- i 7A/IL- 17F. Para la detección de la proteina de IL- i 7A, es decir, como homodiniero de IL-i 7A o heterodimero de IL- 17A/IL- 17F, se usó un anticuerpo anti-IL-17A como anticuerpo de captura y un anticuerpo anti-IL-17A marcado con biotina se usó como anticuerpo de deteeción (ambos anticuerpos estÆn disponibles en R&D Systems, Minneapolis, MN). Para la detección de la proteina IL- i 7F, es decir, como homodimero de IL-i7F o heterodimero de EL- i 7A/IL- 17F se usó un anticuerpo anti-IL-17F-01 (seg(m lo descrito anterionnente) y un anticuerpo anti-IL-i 7F-07 rnarcado con biotina (segün Ió descrito anteriorrnente) como anticuerpos de captura y detección, respeotivamentp. Para la detección do heterodimeros IL-17A/IL-17F, se usô un anticuerpo anti -IL-17A (R&D Systems) como anticirpo de captura y un anticuerpo anti-IL- 17F-07 tiarcado con biotina se usó como anticuerpo do detección. Los anticuerpos IL- i 7A e IL- I 7F no son do reacción cruzada (no se muestran los datos).

[01971 Los ensayos ELISA so realizaron de acuerdo a un protocolo conocido. Brevemente, las placas de ELISA se incubaron en 2 jig/ml de anticuerpo de captura durante la noche. Las placas se 1avaron con PBS/1%BSA para quitar el excedente de anticuerpo de captura y Se incubaron con’ las diluciones en serie del medio condicionado (es decir, citocinas recombinantes IlL- 17A/IL- 17A, IL-i7F/IL- 1 7F, IL-17A/IL-17F) durante 2 horas a temperatura ambiente. DespuØs do lavar la citocina no ligada, se agregó 0,07-0,5 ig’mI do anticuerpo en desarrollo ligado a la biotina y las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas so lavaron para quitar el anticuerpo en desarrollo no ligado, se agregaron concentraciones saturantes de avidina-biotina-peroxidasa y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La avidina-HRP no ligada so lavó con PBS/1% BSA. El ensayo se desarrolló con TBM.

[01981 La Figura 11 demuestra la detección de homodimeros recombinantes do R, 17A y de IL-17F, asi como tambiØn la detección de heterodimeros recombinantes do

IL- 17A/IL- 17F. Al dirigir ambos anticuerpos, de captura y de detección, hacia una citocina, (por ejemplo, IL-17A o IL-17F), se deteetaron tanto homodimeros como heterodimeros de esa citocina (Figuras hA y I 113). En contrast; cuando Se usa un
anticuerpo anti-IL-17A y un anticuerpo anti-IL-17F como anticuerpos de captura y
detección respectivamente, solo se detectan heterodimeros de U,-17A/IL-17F (13’igura
11C). Estos datos sugieren que el par do anticuerpos IL- 17AIIL-17F pueda usarse para
detectar y potencialmente purificar los heterodimeros do IL- I 7A/IL- 17F naturales (es
. decir, no recombinantes) en un medio pondicionado derivado do clulas primarias. Adicionalmente, estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-IL-17F-07 y probablemente los anticuerpos anti-IL-17F-01 y otros anticuerpos anti-IL-17F aqul
descritos tambiØn pueden dirigirse contra heterodimeros de IL- 17A/IL- 17F.

Ejemplo 5.2: Detección de bomodimeros de IL- i7A naturales, homodirneros do IL- i 7F
naturales y heterodimeros do IL- I7AIIL- 17F naturales.

101991 Se activaron cØlulas humanas CD4 T (5 x 105 cØlulas/mi) con anti-CD3 ligados a perlas (perlas de 5.tg/107) y las concentraciones on aumento de anticuerpos anti-CD2S (R&D, Minneapolis, MN) y on ausencia o en presencia de IL-21 (60 ug/nil) o IL-23 (0,5 ng/ml). El material sobrenadmite so recogiO 72 horns despuØs do la activaciOn primaria y se detenninO la coneentración de IL- i7A o IL- i 7F por medio de ELISA para Ia proteina do IL-17A o la proteina do IL-17F, respectivamente, segün lo descrito anteriormente (Ejemplo 5.1). La Figura 12 demuesira que puede usarse IL-21 o IL-23 para aumentar la producciOn do H,-17A. o IL-17F mediante cØlulas T que experinienten una activaciOn primaria. IL-2, IL-7 e IL-15 tambiØn indujeron la producción do IL-17A e IL-17F ante la estimulaciOn con CD3/CD28 (no so muestran los datos).

[02001 Se activaron cØlulas humanas CD4 T (5 x 105 cØlulas/mi) con anti-CD3 ligados a perlas (perlas de 5 j.tg/107) y anticuerpos solubles anti-CD28 durante 48 horns. Se cosecharon las cØlulas T activadas, se dejaron reposar durante la noche y se reactivaron en presencia de anticuerpos anti-CD3 ligados a perlas, anti-CD28, IIL-21 (60 ng/ml) o IL-23 (0,5 ng/ml). El material sobrenadante so recogiO 72 horas despuØs do la activaciOn secundaria y se determinO Ia producciOn do IL- 17A o IL- 17F par ELISA para la proteina do IL- 17A a la proteina de IL- 17F, respectivamente, segi.’tn lo descrito

anteriormente. La Figura 13 demuestra quo se produce una sinergia do IL21 o IL-23 con la coestixnulación do CD28 para aunientar la producción de 11-,17A o IL-17F mediante cØlulas T sometidas a activación secundaria.

[02011 Se somotieron cØlulas humanas CD4 T (2 x 106 cØlulas/mI) a activación primaria anti-CD3 ligados a porlas (perlas de 5 jg/107) y con anticuerpos solubles anti-CD28 (0,5 gg/ml). Despus do 48 horas de activación primaria, so recogió el medio condicionado (CM1) y las cØlulas so dejaron reposar durante la noche. Al dia siguiente, so contaron y volvieron a estimular las cØlulas en 2 x 106 cØlulas/mI segthi lo descrito anteriormente para la activación primaria y en presencia do 60 ng/ml do IL-21. DespuØs de 72 bras de re-estimulación, so recogió el medio condicionado (CM2). So evaluó la presencia o ausencia de homodImerós do IL- 17A, homodimeros do IL- 17F y heterodimeros do IL-17A/IL-17F en CM1 y CM2 puros y diluidos 1:10 usando los formatos do ELISA descritos en el Ejemplo 5.1.
[0202] Los datos indican una deteceiónde homodimeros do IL-17A o heterodImeros de IL- i 7A/IL- 17F escasa o prÆcticamentetiula en los medios CM 1, es decir, los medios de las cØlulas T sometidas a activación primaria ’iguras 14A y 14C). En contrasle, el medio condicionado do cØlulas T re-estimuladas (CM2) contenian no solo homodimeros de IL- 17A y do IL-17F, sino tambiØn heterodimeros de IL-17A/IL-17F (Figuras 14A, 14B, y 14C). Estos datos indican quo las cØlulas T, la fuente "natural" de las citocinas IL-17, oxpresan tanto homodimeros como heterodimeros do IL-17A e IL-17F. Estos resultados tambiØn indican que los anticuerpos dirigidos contra IL-17F pueden reconocer y reaccionar tanto con homodftneros do II, i 7F como con heterodimeros do IL-17A/IL-17F y quo tales anticuerpos pueden usarse para aislar e inhibir la actividad biológica de homodimeros de IL-17F o do heterodimeros do IL-17A/IL-17F.

Ejemplo 5.3: InmunoprecipitaciOn de homodimeros naturales de IL-17A, homodimeros naturales do IL- 17F heterodimeros naturales do IL- i 7A/IL- 17F a partir de cØlulas T.

[0203] El medio condicionado (CM2) derivado de las cØlulas T sometidas a activaciOn secundaria en presencia de IL-21, segiin lo descrito en el Ejemplo 5.2, se mezcló con 20 p.glml do anticuerpos monoclonales de IL-17A-02 antihumana de ratOn (Wyeth) o IL-1717-01 antihumana de ratón (Wyeth) durante 1 hora a 40 C con rotaciOn suave. So

IM

inmunoprecipitó a los complejos de anticuerpos do cada mezcla separadamente eon 50 il de proteina hidratada A-sefarosa durante la mche a 40 C con rotación suave. Luego, los pellets imnunoprecipitados se lavaron secuencialmente eon PBS/1% Tween 20, PBS/0,1% Tween 20 y PBS/0,05% Tween 20. Los pellets inmunoprecipitados se suspendieron nuevainente en una muestra amortiguadora no reductota y so eargaron sobre un gel con 10% do tricina para un anÆlisis de inmunotransferencia, ya sea con conjugación de biotina anti-IL- 17A humana (R&D, Minneapolis, MN) o anticuerpos de conejo anti-IL- i 7F humana (Wyeth).
[02041 Se inniunoprecipitaron homodimers do IL-17F (35 kDa), usando el anticuerpo murino anti-IL-1717-01 humana y so detectaron mediante anÆlisis de inmunotransferencia con un anticuerpo policlonal do conejo anti-IL-17F humana a partir de 500.d de CM2. So inmunoprecijitaron heterodimeros de IL-17F/IL-17A (32 kDa), usando anticuerpo murino anti-IL 17A-02 humana y se detectaron mediante anÆlisis do inmunotransferencia con un anticuerpo policlonal do conejo anti-IL- 17F
humana a partir de 500 d de CM2 (igira 15). Ni el anticuerpo monoclonal ni el
policlonal reaccionaron recIprocamente eon M-1 7A (no se inuestran los datos). Do
manora similar, los homodinieros do IL- 17A (31 kDa) y los heterodimeros de IL- 17F/A
so inmunoprecipitaron usando anticueipo murino anti-IL-17A-02 humana y so
detectaron mediante anªlisis de inmunotrnsferencia, usando un anticuerpo policlonal

S biotinilado anti-IL- 17A do cabra a partir le 700 j.il de CM2. Los heterodimeros de EL-
17F/IL-17A

L-

so imnunoprecipitaron con anticuerpo murino anti-IL-17F-01 humana, y
se detectaron mediante anÆlisisde inmunotransferencia, usando un anticuerpo policlonal
biotinilado de cabra anti-IL- 17A a partir Je 700 jil do CM2 (Figura 16). El anticuerpo
policlonal reacciona reciprocamente con el homodimero de IL-17F on altas concentraciones de proteina (no so muestran los datos).

[02051 Como testigos (banda 2 do las Figuras 15 y 16), los homodimeros de IL- 17F se purificaron desde un medio condicionado concentrado con una sobreoxpresión do IL - 17F humana marcada como His. Brevemente, el medio condicionado concentrado so 1:1 con 100 mM Tris pH 8/1M NaCIJ10 mM in,idazol y so cargaron en una columna do Flujo RÆpido de Niquel-NTA (Qiagen, Valencia, CA). Se diluyó al

pJr

- 91 -

homodimero por pasos con un amortiguador de imidazol de 250 mM. La proteina Sc dializó contra PBS-NSO. Luego, el homodimero the digerido con enterocinasa durante 4 horas a temperatura ambiente para quitarla marca His6. La proteina digerida se diiuyó 1:1 con 50 mM de fosfato de sodio pH 8/20 mM imidazol/300 mM NaCl y se conjugó con una columna Niquel-NTA (Qiagen, Valencia, CA). Se eluyó la proteina menos la marca con un atnortiguador de imidazol de 40 mM y se dializó contra PBS NSO. Los homodimeros purificados de IL-17A para:usar come testigos (banda 5 de la Figura iS) se adquirieron de R&D Systems (Minneapolis, MN).
Ejemplo 5.4: InmunoprecipitaciOn de homodimeros de IL-17A, homodimeros de IL-17F y heterodimeros de IL- i 7F/IL- 17A recombinantes de cØlulas COS transfectadas. 102061 Se realizaron experimentos para determinar silas IL-17F e IL-17A humana recombinantes formarian beterodimeros ante la expresión en cØlulas COS, y si los anticuerpos anti-IL-17F y anti-IL-17A eran capaces de inmunoprecipitar y detectar los heterodimeros de IL- i 7F/IL- 17A. Los cültivos de cØlulas COS theron transfectadas con ADNc de IL-17F, ADNc de IL- 17A, o ADNc de IL-17F y de 1L-17A, y sepermitió que los cultivos de cØlulas transfectadas seoretaran la o las proteinas resuitantes dentro de los medios. El medio condicionado derivado de la expresión de IL-17F o 111-17A o de la co-expresión de IL-i 7F y IL- 17A se mezcló con 20 gg/ml de anticuerpos monoclonales murinos anti-IL-17A-02 humana (Wyeth) o murinos anti-1L-17F-01 humana (Wyeth) durante I hera a 40 C con rotación suave. Los complejos de los anticuerpos de cada mezcla se inmunoprecipitaron separadamente con 50 gI de proteina hidratada y A-serafosa durante la noche a 40 C con rotación suave. Luego, los pellets inmunoprecipitados se lavaron secuencialmente con PBS/1% Tween 20, PBS/0, 1% Tween 20, y PBS/0,05% Tween 20. Los pellets imnunoprecipitados se pusieron en suspension nuevainente en una muestra amortiguadora no reductora y se cargaron sobre un gel de 10% de tricina para anÆlisis de inmunotransferencia yasea con anticuerpos de cabra anti-IL-17A humana (R&D, Minneapolis, MN) o con anticuerpos de conejo anti-IL- 17F humana (Wyeth).

102071 Se inmunoprecipitaron homodimeros de IL- 17F (35 kDa) y heterodimeros de IL-17F/IL-17A usando anticuerpo murino anti- IL-17F-01 humana y se detectaron

-92-

mediante anÆlisis de inmunotransferencia eon un anticuerpo policlonal de conejo anti-IL-17F humana a partir de 50 tl de CM2 (Figura 17A bandas 3 y 4 respectivamente).
Los heterodimeros de IL-i 7F/IL- 1 7A (32 kDa) tambiØn se inmunoprecipitaron usando
anticuerpo murino anti-IL-17A-02 humaia y se detectaron mediante anÆlisis de inmunotrasferencia con un anticuerpo policlonal de conejo anti-IL- 17F humana a partir
de 50.tl de CM2 (Figura 17A banda 9). El anticuerpo IL-17A usado para la inmunoprecipitaeión en las bandas 8 a 10 de la Figura 17A parecia reaccionar
, reciprocamente eon IL- I 7F a altas concentraciones de protelna, ya que se detecta una banda que corresponde a homodimeros IL-17F por medio de la sonda de anticuerpo
anti-IL-17F on la banda 10. Segün se muestra en la Figura 17B, los homodimeros de
IL-17A (31 kDa) y los heterodimeros de IL-17F/IL-17A fueron inmunoprecipitados
usando el anticuerpo murino anti-IL- i 7A-02 humana y se detectaron mediante anÆlisis
de inmunotransferencia usando anticuerpo policlonal de eabra anti-IL-17A humanaa
partir de 50 p1 de CM2(Figura 17B; bandas 3 y 4, respectivamente). TambiØn, los heterodimeros de IL- 17F/IL- 17A se imnuroprecipitaron usando anticuerpo murino afltF IL-17F-01 humana y se detectaron medinte anÆlisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo policlonal de cabra anti-IL-17A humana a partir de 50 p1 de CM2(Figura 17B; banda 6). Contrariamente a1 anticuerpo de IL-17A usado para la inmunoprecipitación en la Figura 17A, ci anticuerpo de IL-17F usado para la inmunoprecipitación on las bandas 5 a 7 de la Figura 1713 no reaccionó reefprocamente de manera significativa con IL-17A, ya que la sonda de anticuerpo anti-IL-17A en la banda 5 no deteeta casi ninguna banda cOrrespondiente al homodimero IL-17A.

[02081 Como testigos (bandas 6 a 7 de la Figura 17A), se purificaron homodimeros de IL-17.F segthi lo descrito en el Ejemplo 5,3. Los homodimeros de IL-17A purificados para ser utilizados como testigos (banda5 de la Figura 17A) fueron adquiridos de R&D Systems (Minneapolis, MN). Los homodimeros testigos purificados de]L-17F emigran ligeramente mÆs rÆpido quelos homodimeros de IL- 17F inmunoprecipitados desde ci medio condicionado. Esto se debe aparentemente a las diferencias en la glicosilación o a la falta de un marcador epitope on las proteinas de IL- 17F en las muestras purificadas.

0

- 93

Ejemplo 5.5: Purifieación de heterodImeros recombinantes de IL› 17A/IL- 17F.

[02091 En este punto so proporcionan dos mØtodos para purificar heterodimeros de IL-17A/IL- 17F. En ci primer mØtodo, so transfectaron cØlulas COS con IL- 17F marcada con His6 (ID DE SEC N° 36) e IL -17A sin marcar. Se agregaron cloruro de sodio e imidazol al medio condicionado hasta lograr cóncentraciones finales do 500 mM y 6 mM, respectivamente. Luego, ci medio condicionado se cargo sobre una colurrma de Niquel NTA (Qiagen, Valencia, CA). Asi, sOlo en la colunina do nIquel se capturaron homodfineros do IL-17F y heterodimeros de IL- I7FIIL-17A con mareador His. Luego, se separó al homodimero do I11-17F y al heterodmero do IL-17F/IL-17A con un gradiente de imidazol y posteriormente digiriO al heterodImero do IL-171F/IL-17A con enterocinasa para quitar ci marcador Hi86. La proteina fue dializada contra PBS. Se realizO el secuenciamiento Edman para Verificar que las proteinas do ILL- 17F y de IL-17A fueran detectadas on la muestra do heterodimero de IL-I 7F/A. Los resultados de la secuencia de terminal N confirmaron la existencia de heterodimeros, es decir, los primeros cinco aminoÆcidos deIL- 17F 4emostraron ser RKIPK (ID DE SEC N° 37) y los de IL-17A demostraron ser IVKAG (ID DE SEC N° 38).

102101 El segundo mØtodo usó un esquona de purificación do columna dual, ci cual se muestra on ci diagrama de flujo expuestp en la Figura 18. La IL- 17A humana marcada (SEQ ID NO 39) y la IL- 17F bumana inarcada con His6 (ID DE SEC N° 36) se clonO en vectores pSMED2 separados (Wyeth) y so coexpresaron en cØlulas HEK293 per lipofecciOn. Brevemente, las cØlulas se sembraron on dos frascos do 175 cn 24 boras autos do la transfeeciOn. Por cada frascà se mezelaron 24 jig pSMED2/IL-17A marcada +24 Vg pSMED2/IL-17F marcada con His6 junto con 120 jil de reactivo TRANSITfi LT1 Mirus, Madison, WI) en 2 ml do medio sin suero y se agregó a un frasco que contenia cØlulas (90% confluente) y25 ml de medio DMEM que contenfa 10% de suero fetal bovino inactivado por calor. Tin dia despuØs de la transfccciOn se quitO ci medio, se enjuagaron las cØlulas lx con tin medio sin suero y Se agregO medio nuevo sin suero (40 mllfrasco). El medio condicionado se cosechó 48 horas mÆs tarde, se flltró (0,45 p.) para quitar las cØlulas y so congeló a 200C. La expresiOn do la proteina the confirmada por anÆlisis deinmunotransferencia usando anticuerpos especificos.

- 1: 94

111 El medio condicionado the conjugado lote con resina compatible anti-marca (Sigma, St. Louis, MO) a 49C durante 2 horas. Las proteinas ligadas, homodfmero 1L-17A y heterodImero do IL-17F/IL- 17A, se eluyeron usando 50 mM Tris pH 8/500 vi NaCl/200 pØptido de marcado (Sigma, St. Louis, MO). Luego, la elución i marcas so conjugó en lote con resina Niqiel-NTA (Qiagen, Valencia, CA) durante noche a 4°C. Se eluyó la proteina ligada, heterodimero do IL- 17F/IL- 17A, con 50 vi Tris pH 8/1 M NaCl/500 mlvi de imidazoL
l21 DespuØs do la purificación do heterodfmeros do IL-17F/IL-17A recombinantes ciicamente sin monodimeros do IL- 17F y do IL- 17A, la actividad do los so probó en cØlulas BJ por la medición de la capacidad del heterodimero
p ra estimular los niveles do GRO-a en el medib do cultivo de las cØlulas BJ. Asi, los itivos de BJ so estimularon con diversas concentraciones de homodimeros de IL- I 7F, omodimeros do IL-17A, u homodimeros de it- 17F/IL- 17A recombinantes purificados. espuØs de 24 horas, el material sobrenadante de los cultivos do BJ so recogió y so eterminaron las concentraciones GRO-c, usindo el ELISA disponible comercialmente.

revemente, se sembraron cØlulas BJ en 5 x 103 cØlulas/pocillo en placas de 96 pocillos e fondo piano y so les aplicaron 15 jti del medio que contenia homodimeros de IL-7A, homodimeros de IL- 17F o heterodfmers do IL- 17F/IL- 17A. Luego, las placas so ncubaron durante 16 a 24 horas a 37°C, dspuØs de las cuales se recogió el material sobrenadante y so determinó la concentración de ORO-a por medio de ELISA tipo emparedado estÆndar con anticuerpos contra GRO-ct (R & D Systems, Minneapolis, MN). Las concentraciones do GRO-c producidas so determinaron sobre la base do una curva estÆndar. Los resultados so muestran on la Figura 19A Similarmente a los homodimeros de IL- i 7F y de IL- i 7A, el hetorodimoro do IL, 17A/EL- 17F es capaz de estimular las concentraciones de GRO-ci do IL-17 on las cØlulas BJ. Ineluso, segün se muestra en la Figura 19B, el tratamiento de cultivos de 13J con anticuerpos anti-IL- 17A o anti-IL-17A en combinación con anticuerpos anti-IL-17F, anularon la capacidad do los heterodimeros de IL-17F/IL-17A pam estimular los niveles GRO-cc.

LI

- 95 -

4TLplo 5.6: AnÆlisis do espeetrometrIa do masa de homodimeros do IL- 17A, odimeros do IL- 17F y heterodfmeros do IL-17A/IL- 17F.
131 Para proporcionar evidencia directa de alguna ligadura de disuifuro entre dos nómeros do IL- 17 se verificó la presencia de ligaduras de disulfuro y so identificaron)tidos ligados pot disulftiro intermolecular (homodftneros do IL-17A, homodfmeros IL- i 7F y heterodImeros de IL-I 7A/IL- 17F),’pot anÆlisisespectromØtrico do masa en dem. So usó division triptica y cromatografla liquida de alto rendimiento do fase ’ersa (CLARfi) para aislar a los pØptidos ligados por disulfuro, los cuales fueron [ujego analizados por nanoLC-MS/MS. Brevemente, do 1 a 2 pg do homodimero do IL-homodImero de IL-17F y heterodirtiero de IL-17A/IL-17F reconibinantes
y no reducidos so activaronen gels 10% Bis-Tris (Jnvitrogen, Carlsbad, CA)
se tiflieron con la soluciOn IMPERJALTh Protein Stain Solution (Pierce, Rockford, ILL), bandas teflidas positivamente se seccidnaron y se digirieron manualmente con ma (Promega, Madison, WI) para el aiÆlisis espectroniØtrico do masa. Para la 3ti6n, los cortes do gel seccionados se deshidrataron en acetonitrilo (ACN), se [rataron y se lavaron en 25 mM de atnortiguador de fosfato do sodio (pH 6,0), y so taron otra vez en ACN. Se agregó tripsina de la enzirna proteasa (0,5 ig de disuelta en 25 mM de amortiguador do fosfato de sodio), se la agregó a los
do gel por rehidratación, y se incuiO durante 4 horas a 37°C. AdemÆs, los pØptidos resultantes fueron extraidos del gel con tres lavados sucesivos, usando acumulaciones de 60% ACN/1% de Æcido fOrmico (FA)y 90% ACN/5% do FA. Estos extractos se combinaron y evaporaron, y so ’reconstituyO la muestra final en 2% ACN y 0,1% FA.

[02141 Las inuestras digeridas se cargaron a prosiOn sobre una columna microcapilar C18 PICOFRIT (New Objective, Woburn, MA), so empaquetaron con perlas Magic Cl 8 (5 gm, 75 p.m x 11 cm, Michrom BioR.esources, Auburn, CA). Luego, la columna se acopló a un espectrOmetro de masa de trmpa lineal de jones (LTQ, ThennoFinnigan, San JosØ, CA). La gradiente HPLC aumeiitO linealmente do 4 al 60% do ACN usando Solvente B como modificador (Solvente A, 2% de ACN y 0,1% de FA; Solvente B, 90% do ACN y 0,1% FA) durante mÆs de70 minutos con un caudal do 250 ni/mm. Los espectros do masa so recolectaron usando LTQ on h modalidad de espectrometria do

en

11!

-96- 9 -

en tandem (con referencia como MS/MS), en donde cada adquisicion de MS fue
la por seis adquisiciones MS/MS de los primeros seis jones peptIdicos mÆs
os on el espectro MS provio. En algunos casos, las adquisiciones MS/MS fueron
Jas de dos adquisiciones MS/MS/MS do los dos primeros iones peptidicos mÆs
os do las adquisiciones MS/MS previas. Las masas de pØptidos se registraron
ndo un margen ni/z (relación masa-carga) do 375 a 1.500. La exclusion dinÆmica software do adquisición proporcionado poi el fabricanto tambiØn se empleó para
itar la cantidad de jones peptIdicos de interØs a ser analizados. Los datos MS/MS
se i terpretaron manualmente.

[02 51 En el nivel MS, el m/z observÆdo en los fragmentos peptIdicos ([+3H]3=9l9,7 para el homodimero do IL- 17A; [M+3H]3=1 196,9 para el ho odimero de]L-17F; [M+3H]3=1.l38,1 o 807,9 para el heterodimero de IL-17F/IL-
17) se correspondla con los candidatos calcuados de pØptidos ligados por disulfato. Ad mÆs, se obtuvo la secuencia peptidica do estas masas blanco segón los datos /MS y so confirmó que eran los pØptidos eon contenido de cisteina esperados ivados do IL-17A o IL-17F para la formación do la ligadura do disulfuro segün se estra en la Figura 20. AdemÆs, se tomó el dato MS3 para el pØptido del homodImero 17A ([M+3H3=907,7 y [M+3H]3=843,3) debido a la escasa fragmentaciOn en el el MS/MS. Esto demuestra que los homodimeros do IL-17A, los homodimeros do 17F y los heterodImeros de IL-i 7F/IL- 17A existen como dimeros mediante ligadura disulfuro. En conclusion, so resolvieron los patrones de ligadura de disulfuro do los homodimeros y del heterodimero que fueron Cl y C4 entre cada monOmero. Se mØtodos similares en este estulio para demostrar la partieipaciOn de otras (C2/C3 y C5/C6) en la formaciOn do la ligadura do disulfuro intramolecular.

6: Los anticuerpos para IL- i 7F humana inhiben la bioactividad de IL- 17F do

Pam detenninar si los anticuerpos anti-IL-17F fueron capaces do reaccionar camente con IL- i 7F de primate, se usaron diversas concentraciones do medio de IL- i 7F de macaco o IL- i 7F humana purificada para estimuiar cØlulas
en presencia o ausencia de 100 tg/ml de anticuerpos anti-IL- 17F-0 1 o anti-IL- i 7F-

-97-

07. /El medio condicionado de 1L-17F de macaco para este experimento se produjo la expresión del ADNc de IL-17F de macaco (ID DE SEC N° 40) subelonado
en CRfl on cØlulas HEK293, y coseebando e medio condicionado que contenia los hoodimeros de IL- 17F de macaco. DespuØs de 16 a 24 horas de tratamiento con IL-17 humana o de macaco, se deterniinaron las concentraciones de GRO-(x del material sorenadante de los cultivos tratados usando ci ELISA disponible comercialmente (.&D, Minneapolis, MN) segin se describe on el Ejemplo 5.5. Las coneentraciones de se determinaron sobre la base de una cm-va estÆndar.

71 La Figura 21 demuestra el aumento de la producción de GRO-cc debido a las BY incubadas xn el medio condicionado de IL-17F de macaco o proteina IL-
7F humana. Segtin los descrito previamente (vet Figura 2y Figura 8), la IL-17F estimula los niveles de GRO-c y esta estimulación es inhibida pot los anti-IL-17F-01 y anti-IL-17F-07(Figura 21A). Como se muestra en la
Figura 21B, la IL-17F de macaco tambiØn estimula la producción de GRO-a on c6lulas BY. Tanto los anticuerpos anti-IL- 1717-0 I como anti-IL- 17F-07 son capaces de inhibit la capacidad del medio condicionado de IL-17F de macaco para estimular los niveles de citocina de GRO-a. AsI, los anticuerpos antagonistas de IL-17F humana pueden reaccionar reciprocamente con IL-17F de primate para inhibir la bioactividad de esta ü ltima.

Ejeniplo 7: La estimulación de IL -17F de los niveles de Agrecanasa 1 en los condorcitos humanos se reduce pot ci cotratamiento con anticuerpos IL-17F.
[02181 Para determinar si la IL-17F puede estar involucrada en la respuesta inflamatoria que acompafia, pot ejempIc, a la artritis reurnatoidea, Sc obtuvo cartila humano sin artritis de National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA) y se aislaron condrocitos pot medio de digestion enzimÆtica en serie de pronasa (1 mg/ml, 37°C durante 30 minutos) y colagenasa P (1 mg/ml, 37°C durante la noche) dentro de 48 horas postmortem. Una vez aisladas, las cØlulas se pusieron en suspension nuevamente en ci media de Eagle modificado par Dulbecco (media DMEM)/P- 12 con 2 M de glutamina L y 100 U/mi de penicilina/100.tg/ml de estreptomicina con un contenido de 10% de suero fetal bovino. Las cØlulas se colocaron en placas de 24

fçj

98 -

pocill s a I x 106 cØlulas/pocillo. El medio se caiibió por medio sin suero despuØs de 72 ho as y los condrocitos se estimularon con IL-:17F huniana en presencia o ausencia
do ti-IL-17F-07 o su isotipo testigo (IgG) durante 6 horas a 37°C. Las cØlulas so
cose aron inmediatamente en amortiguador RLT (Qiagen, Valencia, CA, Kit RNE SYfi) con 3-mercaptoetanol, y so almacenaron a -80°C hasta que estuvieran listas para el aislainiento de ARN. El ARN so preparó usando ci RNEASYfi Mini Kit, y ci
tra iento DNase se realizó en la columna RNEASYO durante 15 minutos a
tern eratura ambiente segün el protocolo del fai,ricante. Los niveles do expresión del in do ADAMTS-4 (agrecanasa 1) fueron monitorizados por ci anÆiisis TAQMAN
RC (Applied Biosystems, Foster City, CA). Brevemente, se usaron 100 ng do ARN
ais ado para la reacción QRCP con sonda/primarios ADAMTS-4 obtenidos do Applied Bi systems. La expresión do ADAMTS-4 so norrnaiizó a la expresión do GAPDH (so us on 10 ng de ARN aislado con primarios GAPDH obtenidos de Applied Biosystems)

[[2cada

muestra. Se preparó una eurva estÆædar para la extrapolación do la muestra
do de 0,16 ng a 100 ng de ARN Total de Referencia Universal (Universal rente Total RNA, Ciontech, Palo Alto, CAL) que consiste en conjuntos de diferentes

os.

9] Los resultados presentados como widades TAQMANfi so muestran en la ra 22. Asi, el tratamiento con IL.. 17F aumenta la expresión de Agrecanasa 1 en los rocitos hurnanos y ci tratamiento con anticuerpos anti-IL-17F-07 anuia esta mulaoión. Estos datos sugieren quo 1apaiticipación de Ia IL- 17F en la inflamaciOn y egradción articular, como ocurre en la artritis autoinmune, por ejemplo, artritis reactiva y reumatoidea, puede ser mitigad4t mediante ci tratamiento con anticuerpos anti-IL-17F.

Ejemplo 8: Regulación de la bioactividad do IL- 17F y de IL-17A mediante la reducción do ABNsi do los receptores de IL- i 7R y do IL- i 7RC en cØlulas BJ
[02201 Se diseæaron experimentos para determinar si una reducción en ci nivel do los transcriptos do IL-17R o IL- I7RC deberian reducir la bioactividad de IL-17F o de IL-17A. Las cØlulas BJ so sembraron 24 horas antes do la transfecciOn on placas do 96 pocillos en una relación medio/pocillo do 9x103 c6lulas/100 1. Las cØlulas fueron

1

- 99

transfecadas con reactivos de ARNi sintetizados quimicamente (Dharmacon, Lafayette, CO), usindo DHARMAFEC7fi 1 (Dharmacon, Lafayette, CO) a 0,3 pi/pocilo y ARNsi individia1 o combinado en 10 nM o menos (ver ID DE SEC N° 17-32), DespuØs de la transfeciOn de ARNsi, las cØlulas se incubaron con los complejos de transfección durant 18 horas. Luego, el medio de transfección se reemplazó por el medio de cultivo regu1a y se incubó durante 6 horas mÆs. A continuación, el medio de cultivo normal se reeml1azó por 150 pi de medio de cultivo que contenla IL-17A a 1 rig/mi a IL- 17F a 50 ng/m. DespuØs de 16 horas de incubación con la citocina designada, se recogió el mate ’al sobrenadante del cultivo para anÆlisis, mediante ELISAde tipo emparethdo esta4dar, de Ia capacidad de la IL- 17F a de Ia JL-17A para inducir niveles de rL-6, IL-8 y GO-a (ver Figura 2). Los pares de anticuerpos coincUentes para hGRO-a, hlL-6 y hIL’8 se adquirieron de R&D Systems (Minneapolis, MN.

[02/211 Pam medir reducciones en los niveles de los receptores de IL- 17R y IL- i 7RC depuØs del tratamiento ARNsi, se usó el kit para ARNin TTJRJ3OCAPTUREfi (Qiagen, V4lencia, CA) para aislar el ARNxn de las cØlulas de fibroblasto BJ de acuerdo a las icciones del fabricante. Se use un protocio de un paso RT qRCP MASTERMIX
Sfi (Eurogentec, San Diego, CA) TAQMANfi (Applied Biosystems) por medio del
l se tomaronlO 41 de ARNm par muestra en las reacciones de 25 41 TAQMANfi P realizadas en un Detector de Secuencia de ADN ABI PRISMfi 7700 (Applied)systems). Las condiciones para ci TAQMANfi RCP fueron las siguientes: 30 nutos a 48°C, 10 nuinutos a 95°C, despu6s40 ciclos, cada uno de 15 segundos a 95°C
I minuto a 60°C, on placas de 96 poillos MICROAMP OPTICALfi (Applied Biosystems), cubiertas con tapas MICROAMP OPTICALfi Cada placa contenia triplicados de los testigos no-modelos a modelos de ADNc para anÆlisis de para cada mezcla de reacción. La expresión de cada gen de ratón fue normalizada a la expresión del gen de microgiobulina P2 humana. Los juegos de sondas/primarios para ci anÆlisis de la expresión de los genes TAQMANfi para IL-17R e IL-i 7RC se adquirieron de Applied Biosystems.

102221 Los resultados presentados en la Figura 23 describen la reducción porcentual en los niveles de GRO-a (normalizado para microglobulina 2) despuØs del tratamiento

0

- 100-

con ANsi de los cultivos BJ. El tratamiento con ARNsi do los cultivos BJ disminuyó los ni eles de transcripción do IL-17R e IL-17RC on aproximadamente un 80% (Figura 23A y Figura 2313 - "Taqman"). Mientras quo la disminución de los niveles de IL- 17R e IL- 17RC redujo la capacidad de IL-17A e IL-17F estimular los niveles de GRO-a (Fi ura.23A y Figura 23B), la disminución de los niveles do IL- i7RC (Figura 23B) tuvo iJJn efecto mÆs marcado que la reducción de los niveles do IL- i 7R (Figura 23A) sobrejla bioactividad tanto de IL-17A como do rE 17F, Cabe resaltar quo la reducción de 1ILl- 17RC tuvo un mayor efecto sobre la capàcidad de IL -17A para estimular los nivels GRO-cx (Figura 2313). Los ejemplos preferidos de ARNsi dirigidos a IL-17R e IL- 1RC so muestran en la Figura 23C (ver tambiØn ID SEC N° 17-32). Estos datos sugi ren que IL- i 7R e IL- i 7RC pueden sefializa a La IL- i7A y a la IL- i 7F y que IL-17R puede ser un receptor preferido para ambas molØculas en relación a la esti ulación de GRO-a.

Eje plo 9: Los niveles de IL-17A e IL- 17F son elevados on los tejidos afectados de paci ntes humanos con psoriasis, enfermedad de Crohn, y colitis ulcerosa.
[02 31 Se tomaron muestras de biopsias dà tejido psoriÆtico do pacientes quo
p ciparon del Estudio Clinico #3067K6-207 patrocinado por Wyeth (estudio
fa acogenÆmico aleatorizado, doble ciego, côntrolado con placebo, exploratorio de
mt leucina humana recombinante once, rhiL- 11, en pacientes con psoriasis activa). Las bio sias do referenda (visita 2) do piel psoriÆtica con y sin lsiones tomadas de 48 pa ientes so congelaron intermitentemente en nitrógeno JIuido inmediatamente do puØs de fa recoleeciOn y se enviaron al Laboraorio Wyeth Clinical Ph acogenomics Laboratory en Andover, MA.

[0 241 Las muestras de la enfermedad de Crohn se tomron de pacientes que pa iciparon en el Estudio Cilnico #3067K6-204 patrocinado por Wyeth (estudio
f acogenómico multicentro, aleatorizado, doble ciego, contolado con placebo, do
se ridad y exploratorie do interleucina bumana recombintnte once administrada
or Imente (RhIL- 11) para el tratamiento do pacientes con enferredad do Crohn activa), y as muestras de colitis ulcerosa so tomaron do pacientes quo prticipaban en el Estudio C Inico #3067K5-114 (estudio farmacogenórnioo multicentro, 4leatorizado, doble ciego,

- 101-

contro ado con placebo, con aumento de dosis, de seguridad y exploratorio de interle cina humana recombinante once administrada oralniente (RhIL- 11) en pacientes con c litis ulcerosa media a moderada del lado izquierdo). Las liopsias pareadas de refer ncia (visita 2) de los tejidos invohicrados o no-invo1ucraos tomadas de los paci tes del estudio #3067K6-204 (16 pacientes) y las biopsias preadas de referencia (visi 1) de tejidos del mismo area anatómica del colon izquierdo y sigmoide de los paci ntes del estudio #3067K5-114 (12 pacientes) se congelaron intermitentemente en nitr geno liquido inmediatamente despuØs de la toma de las mustras y se enviaron al La oratorio Wyeth Clinical Pharmacogenomics Laboratory en Aidover, MA.

[02 51 El tejido se homogenizó con un politron; se aisló el ARN del material so renadante del lisado usando el Mini Kit RNEASYfi (Qiageji, Valencia, CA), y se tr con DNase (Kit para DNase libre de RNase). La preparaci6n de ARN tratada con lase se purifico usando una colunma de gel de bloqueo de fase (Brinkman, Westbury), fenoi:cloroformo:IAA (alcohol isoamjlo) extraido (Airbion, Austin, TX) y tcentrado mediante ci uso de la minicolumna RNBASY. So usó SPECTRAMAX olecular Devices, Sunnyvale, CA) para determinar la canti4ad de ARN y su calidad evaluada con gel Agilent }3ioanalyzer (Modelo 2100; Ailent Technologies, Palo
o, CA). La conversion de 2 g de ARN total a partir de la preparaciones anteriores ADNc se logrO usando ci Kit de registro de ADNc de Alta Capacidad de Applied systems siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas con ci contenido de las reacciones terminadas se aimacenaron a temperaturas de 20°C (a corto plazo) o - 80°C (a largo plazo).

[02261 A los pares de sonda-primarios especificos para cda gen Assays-on-Demand (AOD) de Applied Biosystems se los valida previament; se les bace un control de calidad y se lo optirniza para su uso en cualquier sistema de detecciOn de secuencia ABI PRISM’ (todos de Applied Biosystems). Segdn el protoolo AOD del fabricante, se preparó una mezcla maestra partiendo de la mezcla rnestra de RCP universal de TAQMAN (Applied Biosystems) que contenfa primarics de IL- 17P o EL- 17 y se la colocO en una placa de 96 pocillos para un volumen final 4e 50 p.11pocillo. Se analizaron los pocillos duplicados para estÆndares diluidos en serioliy muestras de ADNc (50 ng/

- 102-

pocilloen un detector do secuencia AB1 PRISMfi 7700 (Software 1.7 del detector de secuenia, usando condiciones do ciclado tØrmico uiiiversales 4 500C durante 2 inuto, 950C durante 10 minutos, 950C durante 15 segundos (40 ciclos) y la extension a 60UCJ durante 1 minuto.

[0227] La cuantificaciOn relativa do los niveles do transcriptos de AM do IL-17F e IL-17A s realizO siguiendo los lineamientos del fabricante descrito para el sistema do detec ion do secuencia ABI PRISM’ 7700 pplied Biosystems). Especificamente, so calcu aron las curvas estÆndar para los estÆnthres de los b1axcos y para control endO eno. Los valores de entrada determinados para los controles blanco y endogeno, usan a la pendiente de la curva estÆndar y la intersección on "br", y los valores do entra de los blancos se normalizaron en control endOgeno. Sc calcul6 el cambio do pEe iie en la expresión de IL-17F e IL-17A utilizando el estadar do 50 ng como cali rador y la concentraciOn relativa de la muestra se obtuvo al nultip1icar el canibio de p iegue por ci calibrador para despuØs promediar.
[02J81 Para utilizar el mØtodo de curva estÆndar se determinOempIricamente un tejido
p expresar el gen blanco usando AOD TAQMANfi (Applied Bosystems). Se obtuvo
ci RN total de los tejidos blanco-positivos de mÆsdo 10 candidaos de Wyeth
(C abridge/Andover) y de proveedores externos. Se convirtieror multiples alIcuotas do
2 g do una preparaciOn simple de ARN en ADNc (segân lo desQrito anteriormente) y
se ombinaron, se airnacenaron a --800C y Se analizar en busca do la, expresiOn del
go blanco par parte de TAQMANfi (Applied Biosystems). Los valores del umbral del ci lo (Ct) do >35 se consideraron par debajo do los limites de detección. Para ci
d sarrollo de Ia curva estÆndar,el objetivo the lograr un valor Cf. entre 18 y25 para 100
n do ADNo teniendo on cuenta un rango dinÆmicoadecuado d la curva estÆndar.Las
p eparaciones do tejido testigo positivo quo cumplian estos reqtisitos se usaron para g nerar la curva estÆndar para cada ensayo. Lascurvas estÆndai consistian on diluciones d bbs on serie de ADNe total a partir de 100 ng/pocillo a 1,5 n’g/pocillo. Las curvas
e ’ndar se realizaron on cada placa para cada ensayo y so usarn para la cuantificaciOn
e las muestras y control del desarrollo do los ensayos. Debido a las restricciones de spacio de las placas do 96 pocillos, los puntas de dilución de la curva estÆndar de25 rig

y3 ng

- 103-

omitieron en el proceso de las muestras. El% CV interpla
de psoriasis y <5% para las muestras de la enfermedad de

the <3% para las
robny colitis

[0229) Los genes que se expresan on niveles similres en todas las muestras (es decir, con y in tratamiento, con o sin lesiones, etc.) se seleccionaron como testigos endogenos en el nØtodo de curva estândar relativa. A partir de una lista de testigos endógenos candi tos, se determinó que el gen designado ZNF592 (Accso a GenBank N° NMO14630) produjo curvas estÆndares aceptab1s y no varió sinificativamente en tejido con o sin lesiones, y on tejidos involucrados y no involurados (p<0,05 para psoria is y p<0,09 para las muestras de la enfermedad de Crohni y colitis ulcerosa). Todas las muestras del estudio se normalizaron a niveles de ZNF592 durante la de valores de concentración relativa.

[0230 Se utilizó la prueba "t" de Student (se parearon las muestras con y sin lesiones, o de tejidos involucrados y no involucrados, de cada pacie9te) para evaluar la impo ancia de la asociación entre los niveles de expresión de IL-17F e IL-17A y el feno p0 lesional (psoriasis) o inflamatorio (enfermedad de Crohi o colitis ulcerosa). Los ambios de pliegues para el estudio de psoriasis se calcularon al dividir los valores de e ncentración relativa de tejido lesional por los valores de concentración relativa de tejid no lesional. Los cambios de pliegues para los estudios de la pnfennodad de Crobn y de la colitis ulcerosa se obtuvieron al dividir los valores de conpentración relativa de tejid involucrado por los valores de concentración relativa de tjido no involucrado. Los ambios de pliegues de resumen se calcularon al promediar ids cambios de pliegues de t dos los pacientes para IL-17F de niveles de IL-17A.

102 11 Los resultados de estos estudios se muestran en la Fi4ura 24 y Figura 25. Co o se muestra en Ta Figura 24, tanto los niveles de expresión 1e IL-17F como de IL-17 aumentan significativamente on tejidos con lesiones de pacjentes enfernios, lo que su ere que IL-17F e IL-17A estÆn involucradas en la psoriasis in vivo. Segün se mu stra en la Figura 25, tanto EL-17A como IL-17F authentan on los tejidos lucrados de pacientes con la enferniedad,e Crohn, asi cono tarnbiØn en los de pa ientes con colitis ulcerosa. La heterogeneidad significativa ’entre pacientes con la

104 -

de Crohn y colitis ulcerosa, junto al tamaflo relativaiente pequeflo de las
muesras, dificultó la identificación de una asociaçión estadisticanente significativa de 1L-l7A e IL-17F con el fenotipo invo1ucrado No obstante,

tn

henamientas de

agloreración mostraron que tanto 11, 17A como U, 17F estaban correlacionadas con l fenotipo involucrado en el conjunto de niuestras de Ia eifermedad de Crohn (r=0, S5) (no se muestran los datos). &tos datos sugieren que los nive1es elevados de IL-17A e IL-17F en los tejidos involucrados pueden jugar un papl en las condiciones inflanatorias asociadas con IBD in vivo.

Ejenplo10: Las cØlulas LN de ratones imnunizados con ovoalbimna producen IL-17F.

[023 1 Se inmunizaron ratones C57BL/6 de 8 semanas de vida los flancos con 100 g e proteina de ovoalbÆmina emulsificada en adyuvante completo de Freund. Siete dIas despuØs, se cosecharon los nódulos linfÆticos inguinales. Lo nódulos linfÆticos se

diso iaron y las cØlulas se volvieron a estimular con 50 ng 4 ester de forbol 12-
tetra lecanoilforbol 13-acetato, 1 jt&4nl de ionomicina y 1 991n de GOLGIPLUGTm dur te 12 horas. Luego se cosecharon las cØlulas y se fiflern en busca de CD4 suprficia1 con anti-CD4 PerCP Cy5.5 de ratón (Pharmagen, an Diego, CA). Las cØlu{as se fijaron y permeabilizaron con CYTOFIX’CYTOPERv1 (BD Biosciences, San Diego, CA), se tifieron con 4 pjg/mi de corjugado IgGi ALXA FLUORfi 647 de rata (Invitrogen, Carlsbad, CA) o con 4 jig/rill de anti-IL-171 (don 15-1) ALEXA FL ORfi 647 de rata (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 30 min4tos. Luego, las cØlulas se avaron dos veces conPERM/WASWM (BD Biosciences, San Diego, CA) y se ana izaron, usando FACSCALIBUR (BD Biosciences, San Dego, CA). Se preparó AL XA FLUORfi 647 anti U. de rata (lon 15-i) (Inviirogen, Carlsbad, CA)
us do un kit de conjugación ALEXA FLUOR 647 de Invitrogen. Los resultados se
mu stran en la Figura 26. De esta manera las cØlulas T CD4+ n vivo de los nódulos de los ratones inniunizados con ovoalbümina produjercrn proteina IL-i 7F.

11: Conclusion y Discusión.
31 Entre varios descubrimientos, estos datos indican que I-21 e IL-23 indujeron 7A e II,I 7F ante la coestirnulaciOn con T(JR/CD28 y que se produce una sinergia I1-23 e IL-21 con la coestimulación para la producciói de IL -17A e IL-17F.

- 105-

Tanto I11-23 como IL-21 son igualmente efectivos en
sugieren que IL-17A y particularmeute IL-17F (del

iriducción de IL-17. Estos datos
a que so produce on 10 a 20
niveles superiores do pliegues compatado con IL- 17 A puede mediar en algunos de los efoctos proinflamatorios atribuidos a IL-21 y que la inhibición do IL-17F (como homodimero do IL-17F o heterodimero de it-i7F)puede tenet efectos terapØuticos sirnilares a los del bloqueo de la seiialización de IL1 (ver Solicitudes de Patentes do EEJJ1J. No 60/599.086 y 60/639.176). Las similitudes entre los efectos de la seæalización de IL-17F y la sefialización de IL- 1 conlievan a una importante conclusion do quo la iithibiciOn do la seflalización de IL-17F puede ser tan valiosa terapØuticamente como la ijthibiciOn de la sefialzaciOn do IL-21. AdemÆs, los resultados muestran por primera vez que las cØ1uas T expresan heterodimeros de IL-17A/IL-17F, asi como tambiØn homodImeros de IL-17A e IL-17F; los resultados tambin muestran que diehas citocinas pueden aislrse y purificarse en sus formas naturales y recoinbinantes. Los datos presentados en este documento tambiØn muestran que los anticuerpos anti-IL-17F, las protelnas do ftisión compuestas do IL-17F y la actuaciOn do ARNsi sobre IL-17R e IL-17RC re en Ia bioactividad de IL-17F. AdemÆs, losresultados muestran quo el tratamiento de IL- I 7F aumenta la expresióu de Agrecanasa en los condrocitos hunianos, lo cual puede ser reducido por los anticuerpos anti-IL-17F, y que las cantidades de IL-17F e IL-17A son elevadas en lesiones psoriÆticasy en tejidos involucrados en IBD tornados de biopsias humanas.

[0234] La IL- i 7A y la IL- i 7F son citocinas proinflamatorias nuevas producidas pot cØlulas T activadas. Estas citocinas comparten un alto grado de identidad de aminoÆcidos, incluso las cisteIiias conservadas que exhiben caracterIsticas estructurales de un nudo de cisteinas. Ambas citocinas han sido propuestas para compartir cadenas de receptores y exhibit funciones biolOgicas simulares. So han involucrado miembros de la faniilia de la citocina IL- 17 en enfermedades niediadas por respuestas inmunes anormales tales como la artritis reumatoidea, trastornos inflamatorios intestinales (IBD) y asma. Debido a las similitudes enumeradas anteriormente, so clasificaron la IL- 17A y]a IL-17F producidas por cØlulas T humanas por activaciOn. Las cØlulas T CD4+ se activaron con anti-CD3 en presencia o ausencia de coestimulación con CD28, citocinas comunes? (IL-2, IL-4, IL-7,.]L-15, IL-21) o IL-23. La produocion optima do IL-17A e

- 106

IL-17F requirió TCR asi como tambiØn coestimulación con CD28. AdemÆs, CD28 e IL-21 actUan en sinergia en la producci6n de IL- i 7A e IL- i 7F, lo que sugiere que IL- 17A e IL-17F pueden mediar los efectos proinflamatorios atribuidos a la seæalización de IL-21. En todas las condiciones de activación, los niveles de proteina de IL- i 7F fueron 10 a 20 veces superiores aquellas obtenidas de IL- i 7A. Cabe resaltar que, ademÆs de los homodimeros de IL- i 7A y los homodimeros de IL- i 7F, las cØlulas T tambiØn produjeron heterodImeros de IL- 17ATIL-17F. Estos descubrimientos sugieren que las multiples formas de estas citocinas estÆn presentes in vivoy que cada forma representa funciones biológicas diferentes; por ejeniplo, que el heterodimero IL-I 7A/IL- I 7F pueda constituir un nuevi blanco de la citocina en el tratamiento de enferrnedades inflamatorias.

- 107-

LO QUE SE REIVNDICA ES:

1. Un niØtodo de selección de compuestos de prueba capaces de antagonizar la sefa1izaci6n de]L-17F que comprende los siguientes pasos:
Poner en contacto a una muestra que contenga IL-17F e IL-17R con un compuesto;

Determinar si la interacción de IL- 17F con IL- 17R on la muestra disminuye on eomparación con la interacción de IL-17F con IL-17R en una muestra que no se ha S. puesto on contacto con el compuesto; donde dicha disrninución on la interacción de IL -17F con IL-17R en la mezcla en contacto con ci compuesto identifique a dicho compuesto como inhibidor de la interacción de IL-17F con IL- 17R y pueda antagonizar la sefialización de IL- 17F.

2. Un mØtodo de selección de compuestos de prueba capaces de antagonizar la seuialización de IL- 17F que comprende los siguientes pasos:
Poner en contacto una muestra que contenga IL- 17F e IL- i 7RC con un compuesto

Determinar si la interacción de IL-OF7F con IL- 17RC en la muestra disminuye on coinparación con la interacción de IL- 17F con IL- 17RC on una muestra que no se haya puesto en contacto con el compuesto
donde clicha disminución en la interacción de IL- 17F con IL- 17R en la mezcla en contacto con el compuesto identifique dicho compuesto como inhibidor de la interacción de IL- 17F con IL- 17R y pueda ntagonizar la seflalización de IL- 17F.

3. Un mØtodo para diagnosticar un trastorno relacionado con el aumento de
la seiialización de IL- 17F on un sujeto que comprende los siguienes pasos:
Detectar una cantidad medida de un producto genØtico de sefialización de IL- i 7F
en una muestra tomada del sujeto y
Comparar la cantidad medida con una cantidad normal del mismo producto genØtico de seflalización de IL- i 7F en una muestra testigo

donde una cantidad medida significativamente superior a la cantidad normal
una indicación positiva en el diagnóstico de un trastorno relacionado con el
o de la seflalización de IL, 17F.

4. El mØtodo de la reivindicación 3, donde el trastorno se selecciona a partir grupo que comprende enfermedades autoinmunes, enfermedades respiratorias y inflamatorias intestinales.

5. El mØtodo de la reivindicación 4, donde el.producto genØtico de seflalización de
IL 17F es un producto genØtico de IL-17F.

6. El mØtodo de la reivindicaoión 4, donde el producto genØtico de seflalización de
lL 17F es un producto genØtico de IL, i 7R.

7. El mØtodo de la reivindicación 4, donde el producto genØtico de sellalización de
IL 17F es un producto genØtico de IL- 17RC.

8. Un mØtodo de tratamiento para un sujeto con riesgo de contraer o a quien se le ha
dignosticado un trastorno relacionado con el aumento de la seflalización de IL- 17F que la administración de una cantidad terapØuticamente eficaz de un antagonista de la
de 11-1 7F al sujeto.

9. El mØtodo de la reivindicación 8, donde el antagonista de la sefialización de IL-
17F se selecciona a partir del grupo que comprende polinucleótidos inhibidores de IL-17F, polinucleótidos inhibidores de IL-17R, polinucleótidos inhibidores de IL-i 7RC, polip6ptidos solubles y sus fragmentos de union a IL- i 7R o IL- i 7F, polipØptidos solubles y sus fragmentos de union IL-17RC o IL-17F, anticuerpos inhibidores anti-IL-17F, anticuerpos inhibidores anti-IL-i 7R, anticuerpos inhibidores de IL-i7RC y molØculas an agonistas pequeflas.

10 El mØtodo de la reivindicaeiOn 9, donde el antagonista de la sefialización de IL -
17F es an polinucleOtido inhibidor de IL- i 7.R.

11.
17

- 109-

El mØtodo de la reivindieaeión 9, donde el antagonista de la sefializaeión de IL-
un polinucleótido inhibidor de IL- 17RC.

12. El mØtodo de la reivindicación 10, donde el polinucleótido inhibidor es un ARNsi
selecionado a partir del grupo que comprende las secuencias nucleótidas presentadas en las ib DE SEC N° 17 a 24.

13. El mØtodo de la reivindieación 11, donde: el polinucleótido inhibidor es un ARNsi
sele cionado a partir del gmpo que comprende las secuencias nucleótidas presentadas en las ID DE SEC N°25a32.

14. El mØtodo de la reivindicación 9, donde el antagonista de la sefialización de IL -
17F es un polipØptido soluble que comprende sus fragmentos de union a IL- 17R o IL-17F

15. El mØtodo de la reivindicación 9, donde el antagonista de la sefializaciOn de IL-
17F es un polipØptido soluble que comprende sus 1agmentos de union a IL-17RC o IL-1 7F

16. El mØtodo de la reivindicación 14, donde el polipØptido soluble tiene la secuencia
de a ninoAcidos presentada en la ID DE SEC N° 34.

17.El mØtodo de la reivindicaciOn 15, donde el polipØptido soluble tiene la secuencia de aninoÆcidospresentada en la ID DE SEC N° 35.

18. El mØtodo de la reivindicaciOn 9, donde el polinucleOtido inhibidor de IL-17F
omDrende la secuencia de nucleótidos presentada en ID DE SEC N° 1, o una secuencia uclOtida complementaria a dicha secuencia, o tin fragmento de la secuencia de ID DE SECI N° 1, o uno de sus ARN equivalentes, y donde la expresión del polinucleótido Lnhilidor en una cØlula resulta en la reducción de la expresiOn de IL- 17F.

- 110-

1. El znØtodo do la reivindicación 9, donde el polinucleótido inhibidor do IL-17R
la secuencia de nucleótidos presentada en ID DE SEC N° 5, o una
a dicha secuencia, 0 un fragmento de la ID DE SEC N° 5, o uno do sus
equivalentes, y donde la expresióu del polinucleótido inhibidor en una cMula
en la reducción do la expresión do IL-17R

0. El mØtodo de la reivindicación 9, donde el polinucleótido inhibidor de IL-I7RC
omprende una secuencia de nucleótidos selŁccionada apartir del grupo quo comprende as secuencias do nuc leótidos presentadas en las ID DE SEC N° 7, ID DE SEC N° 9, ID E SEC N° ii, ID DE SEC N° 13 e ID DE SEC N° 15, o una complementaria a la ecuencia seleccionada a partir do dicho grupo, 0 Ufl fraginento do una secuencia de nueleótidos seleocionada a partir del grupo que comprende las secuencias de nucleótidos ID DE SEC N° 7, ID DE SEC N° 9, ID DE SEC N° 11, ID DE SEC N° 13 e 11) DE SEC N° 15, o UflO de sus ARN equivalentes y dłnde la expresión del polinucleótido inhibidor en una cØlula resulta en la reducción do la epresión de IL- 17RC,

21. El mØtodo do la reivindicación 8, donde el trastorno relacionado con el auniento
do la sefiaiización de IL- 17F es un trastorno inflamatorio.

22. El mØtodo do la reivindicación 21, donde el trastorno inflamatorio se selecciona a
partir del grupo que comprende una enfetniedad autoinmune, una enfennedad respiratoria y una enfermedad inflamatoria intestinal.

23. El mØtodo de la reivindicación 22, donde el trastorno inflarnatorio es una
enfermedad autoinmune y la enfermedad Æutoinmuuese selecciona a partir del grupo que comprende artritis, psoriasis, lupus eritematoso sistØmico y escierosis multiple.

24. El mØtodo de la reivindicación 23, donde la enfermedad autoinmune es artritis
reumatoidea.

25. El mOtodo do la reivindicación 22, donde el trastorno inflamatorio es una
enfermedad respiratoria y la enfermedad respiratoria es fibrosis quistica.

01-

- 111 -

El mØtodo de la reivindieación 22, donde el trastorno inflaniatorio es una inflatnatoria intestinal.

27/. El rnØtodo do la reivindicación 8, quo comprende ademÆs administrar al sujeto
cantidad terapØuticainente eficaz do al menos un agente terapØutico adicionaL

El inØtodo de la reivindicación 27, donde ci al menos un agente terapØutico
so selecciona a partir del grupo que comprende inbibidores do citocina,
del factor de orecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, metabólicos, inhibidores do enzimas, agentes citotóxicos y agentes

9. El mØtodo do la reivindicación 27, donde al menos un agento terapØutico
dicional es seleccionado a partir del grupo quo comprende antagonistas do FNT, agentes nti-FNT, antagonistas de IL-12, antagonistas de IL-15, antagonistas de IL-17, tagonIstas de IL- i 8, antagonistas de IL-22, agentes agotadores de cØlulas T, agentes gotadores do cØlulas B, ciclosporina, iK-506, CCI-779, otanercept, infliximab, tuximab, adalimumab, prednisolona, azatioprina, oro, sulfasalacina, cloroquina, idroxicioroquina, minociclina, anakinra, abatacept, metotrexato, leflunoniida, rapamicina, anÆlogos de rapamicina, inhibidores de Cox-2, inhibidores de cPLA2, FAINE, inhibidores do p38, antagonistas de B7,1, B7,2, ICOSL, ICOS o CD28, y / agonista de CTLA4.

30. Un rnØtodo para inhibit la capacilad do NF-icB para activar prornotores quo
respondan a NF-KB on una poblaciOn celular o un sujeto, quo comprende administrar un antagonista de la seflalizacidn de IL- 17F a la población celular o al sujeto,

31. El mØtodo de la reivindicación 30, donde ci antagonista de la seæalización de IL-
17F se selecciona a partir del grupo quo comprende polinucledtidos inhibidores de IL-17F, polinucleótidos inhibidores de IL-17R, polinucleótidos itthibidores do IL-17RC, polipØptidos solubles y sus fraginentos de union a IL, i7R o IL- I 7F, polipØptidos solubles y sus fragtnentos de uniOn a IL-17RC o IL-17F, anticuerpos inhibidores anti-IL-17F,

inhibidores anti-IL-17R, anticuerpos inhibidores]L-17RC y molØculas pequeæas.

Un mØtodo para inhibir una bioactividad de IL- i 7F on una población celular 0 Ufl
y con ci que se administre un antagonista de la seæalizaciOn de IL-17F a la celular 0 al sujeto.

El mØtodo de la reivindicación 32, donde el antagonista de la seflalización de IL-
17F Se selecciona a partir del grupo que comprende polinucleótidos inhibidores de IL-polinucleótidos inhibidores de IL-17R, polinucleótidos inhibidores de IL- I7RC, pØptidos solubles y sus fragmentos de union a IL- 17R o IL- i7F, polipØptidos solubles sus fraginentos de uniOn a 1L-17RC o IL-17F, anticuerpos inhibidores anti-IL-17F, ticuerpos inhibidores anti-IL- 17R, anticuerpos inhibidores IL- 17RC y molØculas tagonistas pequefias.

El mØtodo de la reivindicación 32, dcnde la bioactividad de IL-17F se sele eciona partir del grupo que comprende diferenciaciOn neutrófila, reclutamiento de neutrófilos e de citocina.

Una composiciOn farmacØutica que eomprenda un antagonista de la sefializaciOn
IL- 17F y un agente portador farniacØuticamente aceptable.

36. La composición farmacØutica de la reivindicaciOn 35, donde el antagonista de la seflalizaciOn de IL-17F se selecciona a partir del grupo que comprende polinucleótidos inhibidores de IL- 17F, polinucleótidos inhibidores de IL- 17R, polinucleOtidos inhibidores de IL-17RC, polipØptidos solubles y sus fragmentos de uniOn a IL-17R o 1L-17F, polipØptidos solubles y sus fragnientos de uniOn a IL-17RC o IL-17F, anticuerpos inhibidores anti-IL-17F, anticuerpos inhibidores anti-IL-17R, anticuerpos inhibidores IL-17RC y molØculas antagonistas pequeflas.

- 113-3*

371./ Un adyuvante de vacuna que comprenda un antagonista de seflalización de IL* 17F
y Jun antigeno seleccionado a partir del grupo que comprende un autoantigeno, Un un aloantigeno y sus fragmentos.

El adyuvante de vacuna de la reivindicación 37, donde el antagonista de la ización de IL- 17F se selecciona a partir del grupo que comprende poiinucleótidos idores de IL- 17F, polinucleOtidos inhibidores de IL- 17R poiinucleótidos inhibidores IL-17RC, polipØptidos solubles y sus fragmentos de union a M,- 17R o IL-17F, solubles y sus fragmentos de uniOn a IL-17RC o IL-17F, anticuerpos anti-IL-17F, anticuerpos inhibidores anti-IL-17R, anticuerpos inhibidores de
I7RC y molØculas antagonistas pequeuias.

Un anticuerpo aislado capaz de conjugarse especificamente con Ea secuencia aminoÆcidapresentada en la ID DE SEC N° 6.

40. Un anticuerpo aislado capaz de conjugarse especificamente con una secuencia
aminoÆcida seleccionadaa partir del grupo que comprende las secuencias aminoÆcidas presentadas en la ID DE SEC N° 8, ID DE SEC N 10, ID DE SEC N° 12, ID DE SEC N° 14eIDDE SEC N° 16.

41. El anticuerpo de la reivindicac6n 39, donde el anticuerpo antagoniza la
sefializaciOn de IL- i 7F.

42. El anticuerpo de la reivindicaiOn 40, donde el anticuerpo antagoniza la
seflalización de IL- i 7F,

43. Un anticuerpo aislado capaz de conjugarse especIficamente con la protelna de IL-
17F.

44. El anticuerpo de la reivindicaciOn 43, donde la proteina de IL-17F se deriva de un
ser humano o un primate.

- 1141

114 -

El anticuerpo de la reivindicación 43, donde la protelna de IL- 17F es multimØrica.

El anticuerpo de la reivindicación 45, donde la protemna de IL- 17F es un
de IL- 17F o un heterodimero de IL- 17F.

7. El anticuerpo de la reivindicación 46 donde la protelna de IL-17F es un
eterodimero, y donde ci heterodimero de IL- 17F es de IL- 17A/IL- 17F.

8. El anticuerpo de la reivindicación 43, donde ci anticuerpo inhibe la bioactividad
c EL- 17F.

49. El mØtodo de cualquiera de]as reivindicaciones 1-3 y 8, donde la seiialización de
IL- I 7F es mediada por un homodirnero de IL- I 7F, un heterodimero de IL- i 7F, o tanto un homodImero de IL- 17F coino un heterodimero de IL- 17F.

50. El mØtodo de la reivindicación 49, donde Ia sefialización de IL- 17F es mediada, al
menos en parte, por un heterodimero de IL-17F, y donde el heterodimero de IL- 17F es de

IL-17A/IL-17F.

51. El mØtodo de la reivindicación 32, donde la bioactividad de IL-17F es mediada
por un homodlitnero de II, 17F, un heterodimero de R, 17F, o tanto por un hornodimero de IL- i 7F como por un heterodimero de fl- 1 7F.

52. El mØtodo de la reivindicación 5 1 donde la bioactividad de IL- i 7F es mediada, al
nienos en parte, por un heterodimero de IL- 17F, y donde ci heterodimero de IL- 17F es de IL- 17A/IL-17F.

53. La composición farrnacØutica de la reivindicación 35, donde ci antagonista de la
seflalización de IL- 17F antagoniza a un homodimero de IL-17F, un heterodimero de IL-17F o tanto un honiodiniero de IL- i 7F oomo un heterodimero de iL-i 7F.

- 115-

54 El adyuvante do vacuna de la reivindicación 37, donde el antagonista de la
3ealizaci6n de 1L- 17F antagoniza a tin homodimero de IL- 17F, un heterodimero de IL

I

0 tanto un homodimero de IL, 17F como tin heterodimero do IL- 17F.

Un mØtodo para inhibir al menos una actividacl asociada con la seflalizaciOn do
21 que comprende antagonizar la seflalización de IL- I 7F.

Un mØtodo para inhibir al menos una actividad asociada con la sefialización de
23 que comprende antagonizar la sefialización de IL- 17F.

El mØtodo de la reivindicación 55, donde la sefialización do IL-17F es mediada
run homodimero de IL, 17F, tin heterodimero de EL-17F o tanto por el homodimero do 17F como por el heterodimero de IL- i 7F.

El mØtodo de la reivindicación 57, donde la seüalización do IL- 17F es mediada, al
on parte, per tin heterodimero do IL-17F, y donde el heterodimero do IL-17F es de

17A/IL- 17F.

59. Un mØtodo de purificación do la proteina natural de IL- 17A que comprende:
a) activación de cØlulas T en medios;
b) inmunoprecipitación do la proteina do IL- 17A desde los medios.

60. Un rnØtodo do purificación de la proteina natural de IL-17F que comprende:
a) aotivaciOn de cØlulas T on medics;
b) inmunoprecipitacióu de la proteina de IL- 17F desde los medios.

61. El mØtodo de la reivindicación 59, donde la proteina de IL, 17A es tin
homodimero de IL- i 7A, un heterodimero do IL- i 7A o tanto un homodimero de IL- i7A como un heterodimero de IL- 17A.

62. El mtodo de la reivindicación 60, donde la proteina de IL-17F es un
imero de IL- 17F, tin heterodimero de ILL- 17F o tanto tin homodImero de IL-17F un heterodimero de IL- i 7F.

63. El mØtodo de la reivindicación 61, donde la proteina de IL-17A es un
imero, y donde el heterodimero de IL- 17A es de IL- 17A/IL- 17F.

64. El mØtodo de la reivindicaciOn 62, donde la proteina de IL-17F es un
imero, y donde el heterodimero de IL, i 7F es de IL- 17A/IL- 17F.

El mØtodo de la reivindicación 59 6 60, donde los medios comprenden IL-21.

Una proteina aislada de IL-17F, donde loteIna de 114-17F es un homodImero
IL- 17F o tin heterodimero de IL-17F.

La proteina de IL- i 7F de la reivindicación 66, donde la proteina de IL- i 7F se
la a partir de una fuente natural.

La proteina de IL- i 7F de la reivindicación 67, donde la fuente natural es al menos cØlula T.

69. Una proteina de 1L-17A aislada, donde la proteina de IL- 17A es un homodImero
de IL- 17A o tin heterodimero, de IL-17A.

70. La proteina de IL-17A de la reivindicación 69, donde la proteina de IL- 17A se
alsia a partir de una fuente natural.

71. La proteina de IL- 17A de la reivindicación 70, donde la fuente natural es al
menos una cØlula T.

72. Un mØtodo pam inhibir al menos una aetividad asociada con la sefializaeión de
IL-17A y que incluya la administración de un antagonista de IL- 17F.

A’

- 117-

73 Un mØtodo para aislar heterodimeros de IL- 17AIIL-17F prÆcticamente sin de IL, 17A y homodImeros de IL-17F que incluye:
a) expresar una proteina de fusion de IL- 17A y una proteina de fusion de IL- 17F
on cØlulas anfitrionas cultivadas on medios, donde la, protefna de fusion de IL-
17A comprende una protemna de IL- 17A o fragmento de la misma unido a una
primer marca de afinidad y donde la proteina de fusion de IL- i 7F comprende
una proteina de IL- 17F o fragmento unido a una segunda marca de afinidad;
b) permitir que las cØlulas anfitrionas secreten la proteina de fusion de IL- 17A y la proteina de fusion de IL- 17F dentro de los medios;
c) colocar los medios sobre una priniera columna de afinidad bajo condiciones no reductoras, de, tal modo que la proteina de fusion de 1L- 17A se una a la primera columna de afinidad;
d) eluir la proteina ligada desde [a primera columna de afinidad en condiciones no reductoras;
e) colocar el eluyente obtenido on ci paso d) sobre una segunda columna de afinidad en condiciones no reductoras, de modo que la proteina de fusiOn de
IL- i 7F se una a la segunda columna de afinidad;
f) eluir la proteina ligada desde la segunda columna de afinidad encondiciones
no reductoras,

el que el eluyeute obtenido del paso f) contiene proteina de fusion de I11 -17A y (Ic fusion de IL- i 7F en forma de heterodimeros de IL- i 7AJLL- 17F.

4. Un mØtodo para aislar heterodimeros de IL- I 7A/IL- 17F prÆoticamente sin homodImeros de IL- i 7A y honiodimeros de IL-i 7F que comprende:
a) expresar una proteina de fusion de IL- i 7A y una proteina de ftisión de IL- i 7F
en cØlulas anfitrionas cultivadas en medios, donde la proteina de fusion de IL-
17F comprende una proteina de IL- 17F o fragmento de la misma unido a una
primer marca (Ic afinidad y donde la proteina de fusiOn de IL- i 7FA comprende una proteina de IL- 17A o fragmento unido a una segunda marca de afinidad;

F

b) pennitir que las cØlulas anfitrionas secreten la proteina de fusiOn de IL-17A y la proteina de fusion de IL- 17F dentro de los medios;
c) colocar los medios sobre una priniera columna de afinidad on condiciones no reductoras pam que la proteina de fusion de IL-17F se una a la primera columna de afinidad;
d) eluir la proteina ligada desde la primera columna de afinidad en condiciones no reductoras;
e) colocar el eluyente obtenido del paso d) sobre una segunda columna de afinidad en condiciones no reductoras pam que la proteina de fusion de]L-
1 7A se una a la segunda columna de afinidad;
f) eluir la proteina ligada desde la segunda columna de afinidad en condiciones no reductoras,

ci que ci eluyente obtenido del paso f) contiene proteina de fusiOn de IL-17A y teIna de fusion de IL- 17F en forma de heterodimeros de IL- 17A/IL-I 7F.

Un heterodlinero de IL- 17A/IL- 17F aislado de acuerdo con ci mtodo de la vindicación 73 74.

- 119-

presente invento proporciona polinucleótidos y polipØptidos aislados y purificados con la via de seflalización de IL- i 7F. El experimento tambiØn proporciona icuerpos para homodImeros de IL-17F y heterodimeros de 1L-17ALIL-17F y mØtodos a aislar y puriflcar miembros de la faniilia IL-17, incluso heterodImeros de 1 7AJIL- 1 7F, a partir de una fuente natural. Este invento tarnbiØn se concentra en nuevos para el diagnóstico, pronóstico, control dl progreso y tratamiento o
n de trastornos relacionados con la seflalización de IL-17F, es decir, trastornos
con IL-17F, incluso, entre otros, trastornos inflamatorios tales como nfennedades autoinmunes (por ejemplo, artritis, artritis reumatoidea, psoriasis, lupus ritematoso sistØmico y escierosis nitltiple), enfermedades respiratorias (por ejemplo, POC, fibrosis cistica, asma, alergia), rec1azo de trasplantes (incluso transpiantes de ó rganos sólidos) y enfermedades o trastmos inflamatorios intestinales (IBD, por ejemplo, colitis ulcerosa, enferinedad de Crohn). Asiniisnio, este invento apunta a blancos terapØuticos y terapias nuevas como asi tambiØn a mØtodos para seleccionar y evaluar los coinponentes de ensayo para la intervenció n (tratamiento) y prevenciOn de trastornos relacionados con la sefializaciOn de IL- 17F.

NY Main BOGDMS-126512-v1-DOC