



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-025345- -00000-0000

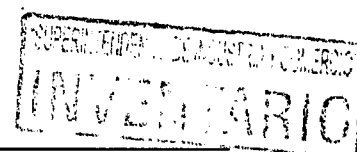
Fecha: 2014-02-06 16:47:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-033096- -00013-0000

Fecha: 2014-02-06 16:47:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 4



21. EXPEDIENTE No. 09-033.096A

54. TÍTULO **"POLIPEPTIDOS HETERODIMERICOS IL-17A/F"**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **A61K 38/20**

71. SOLICITANTE **GENENTECH, INC.**

DOMICILIO SOUTH SAN FRANCISCO, ESTADO DE CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. **- 6 FEB 2014**

(FORMA P 10)



No. 09-033096- -00013-0000

Fecha: 2014-02-06 16:47:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 4

No. 14-025345- -00000-0000

Fecha: 2014-02-06 16:47:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4**DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES****1. Identificación del Trámite**☐ Conversión☒ División☐ Fusión☒ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad**2. Datos del Solicitante:**Persona Natural ☐Persona Jurídica ☒**GENENTECH, INC.**

Nombre o Denominación / Nombre o Razón Social Completa

ALICIA LLOREDA RICAURTE

Nombre Representante Legal

Tipo de Empresa

Micro ☐Pequeña ☐Mediana ☐Otra ☒

Documento de Identificación

☒ C.C.☐ C.E.☐ NIT☐ Otro Número**39.690.713**

Nacionalidad / País de Constitución	Dirección y Domicilio del Titular	Ciudad
Estado de Delaware, Estados Unidos de América	1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, Estados Unidos de América	South San Francisco
Dirección Electrónica		Fax
notificacionespatentes@lloredacamacho.com		6069701
		Número Telefónico
		3264270

☒ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del Apoderado:**LLOREDA RICAURTE ALICIA**

Apellidos y Nombre

C.C. 39.690.713

Documento de Identificación

53.215

Tarjeta Profesional

Dirección y Domicilio		Ciudad
Calle 72 No. 5-83 Piso 5º		Bogotá D.C.
Dirección Electrónica	No. Fax	Número Telefónico
notificacionespatentes@lloredacamacho.com	6069701	3264270

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

4. Datos del Trámite		
CONVERSIÓN Expediente No. _____ De: _____ A: _____	DIVISIÓN Expediente No. <u>09-003.906</u> No. Divisionales <u>1</u>	FUSIÓN Expediente No. _____ Expediente No. _____

5. Comprobante de Pago No. <u>14-003079</u>	Fecha: <u>Enero 14, 2014</u>

6. Anexos
☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación. ☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación. ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división. ☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud. ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma		
ALICIA LLOREDA RICAURTE	Representante Apoderado	
Nombre y apellidos	C.C. 39.690.713 de Usaquén	53.215
Identificación		Tarjeta Profesional

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 003079

Bogotá D.C., Enero 14 de 2014 - 10:04:02

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.

NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	2961	13/01/2014		4.640.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	464.000.00	464.000.00
			\$464.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SESENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-025345- -00000-0000

Fecha: 2014-02-06 16:47:04
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-033096- -00013-0000

Fecha: 2014-02-06 16:47:04
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 851 DIVISIONALDep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 4

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 14 de 2014 - 10:04:06

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0012872

Bogotá D.C., Febrero 04 de 2014 - 13:44:30

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.

NI 830.022.145

***** Soporte del Pago *****

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	651483615	04/02/2014	7.734.000.00

***** Conceptos Pagados *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	155.000.00	155.000.00
				\$155.000.00

SON: **CIENTO CINCUENTA Y CINCO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-033096- 00013-0000

Fecha: 2014-02-06 16:47:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-025345- 00000-0000

Fecha: 2014-02-06 16:47:04 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.slc.gov.co e-mail: info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Febrero 4 de 2014 - 13:44:34

4

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: <u>2014</u> / <u>02</u> / <u>06</u> AAAA MM DD 2014	
		Recorrido: 4	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	9-33096	13	7
2	14-25345	0	7
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
☒	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones: EL CD CONTIENE UN TOTAL DE 8 ARCHIVOS: 8 EN FORMATO PDF, LOS CUALES FUERON PROCESADOS. EL CD SE ENCUENTRA UBICADO EN EL FOLIO 4

Traducción Oficial N° 10-31-191

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ibar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: TERI LEE
3. actuando en calidad de: Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello y estampilla de TERI LEE, Notario Público

CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
 6. el día tres (3) de Octubre, año 2005
 7. por el Secretario Adjunto de Estado, Estado de California
 8. Número: **258054**
 9. Sello/Estampilla
 10. Firma: (Ilegible)
- Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "The Great Seal of the State of California"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



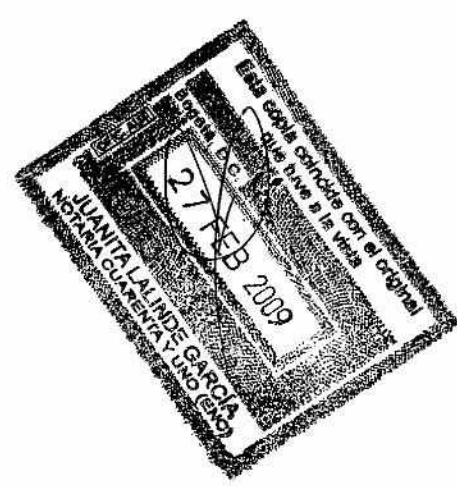
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:58

Uu
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTIA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

174484
Jlba/Espe
CUYA FIRMA ATARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS



CALIFORNIA RECONOCIMIENTO PARA TODO FIN

Estado de California)
) ss.
Condado de San Mateo)

El día 13 de Septiembre, año 2005, ante mi, TERI LEE, Notario Público, compareció personalmente TIMOTHY R. SCHWARTZ, a quien personalmente conozco como la persona cuyo nombre suscribe el documento, y quien reconoció en mi presencia haber formalizado el mismo dentro de su investidura, y que mediante su firma en el documento, la persona o entidad en cuyo nombre actuó, formalizó el documento.

En TESTIMONIO firmo y sello

Firma (ilegible)

N. del T: hay un sello: TERI LEE, Comisión Nº 1514234, Notario Público, California, Condado de San Mateo.

OPCIONAL

Descripción del documento adjunto

Título o Clase de Documento: Colombia Power

Fecha: 9/13/2005

Número de páginas: 1

Firma diferente de la mencionada anteriormente: *Ninguna*

PODER DE REPRESENTACION LEGAL

Documento escrito en idioma Inglés y Español, suscrito por Genentech, Inc., con domicilio en 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, EEUU.

DADO Y FIRMADO EL DIA TRECE (13) DE Septiembre año 2005

Firma (ilegible)

N. del T.: Hay un sello de tinta: Timothy R. Schwartz, Ph. D.- Asesor Sección de Patentes - Genentech, Inc. -

Signatario Corporativo Autorizado.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1999



Traducción Oficial N° 10-31-192

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
 6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
 7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
 8. Número: 0265282
 9. Sello/Estampilla
 10. Firma: (Ilegible)
- Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

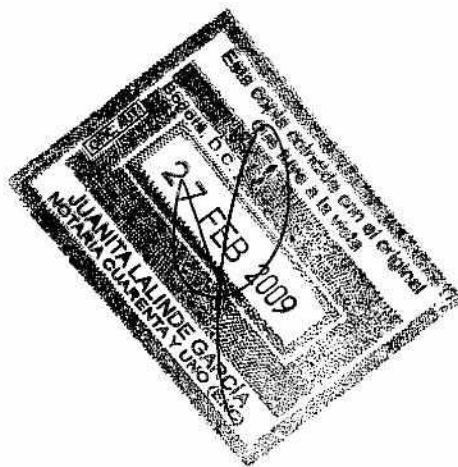
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

174485

2005 OCT 31 A 10:59

Tlba
Cuya firma aparece en el
DOCUMENTO DE EMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

Jefe de Legaciones
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE "GENENTECH, INC." ESTA DEBIDAMENTE INCORPORADO BAJO LAS LEYES DEL ESTADO DE DELAWARE Y GOZA DE BUENA REPUTACION Y TIENE EXISTENCIA CORPORATIVA LEGAL, TAL COMO LO MUESTRAN LOS REGISTROS DE ESTE DESPACHO, EN LA FECHA DEL SIETE (7) DE OCTUBRE, AÑO 2005.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE DICHO "GENENTECH, INC." FUE INCORPORADO EL DIA VEINTITRES (23) DE DICIEMBRE DEL AÑO 1986.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE LOS REPORTES ANUALES HAN SIDO RADICADOS HASTA LA FECHA.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE LOS IMPUESTOS DE FRANQUICIA HAN SIDO PAGADOS HASTA LA FECHA.

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACIÓN: 4212779

FECHA 10-07-05

N. del T.: Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"



Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ibar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

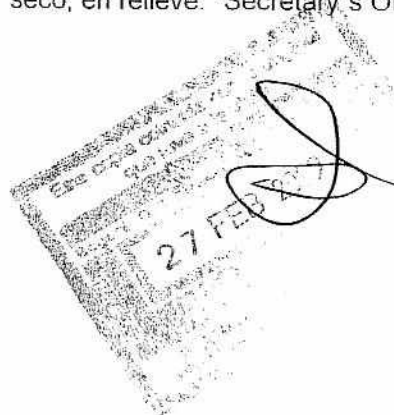
1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265283**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

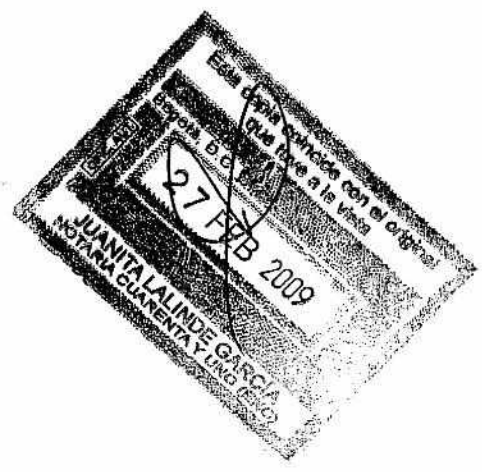
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFES DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

174487
Jlbar Espinal
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO REFORMULADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA VEINTIDOS DE JULIO DEL AÑO 1999, A LAS 9:00 A.M.

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212780

FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"


ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



**CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
MODIFICADO Y REFORMULADO
DE GENENTECH, INC.**

Genentech, Inc. (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, por el presente modifica el Certificado de Incorporación de la Corporación, qué fue registrada originalmente el 23 de diciembre, 1986 bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y posteriormente modificado.

El Certificado de Incorporación de la Corporación es por el presente reformulado y adicionalmente modificado, para leerlo en su integridad como sigue:

ARTÍCULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech Inc.

ARTÍCULO 2

La dirección del domicilio social de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, Condado de New Castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTÍCULO 3

El objetivo social de la Corporación es llevar a cabo cualquier acto o actividad lícita para la cual puedan organizarse las corporaciones bajo la Ley Corporativa General del Estado de Delaware como la misma existe o cómo pueda modificarse de ahora en adelante ("Ley de Delaware").



ARTICULO 4

SECCION 4.01. *Capital Accionario.* (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas respectivamente, acción preferencial y

acción ordinaria. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de cuatrocientos millones (400.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, valor nominal \$0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Trescientos millones (300.000.000) se denominarán acciones ordinarias, valor nominal \$0.02 por acción ("**Acción Ordinaria**"). La Acción Ordinaria de la Corporación, será toda de una clase.

(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones se puede aumentar o disminuir (pero no por debajo del número de acciones de las mismas, entonces circulación) mediante el voto afirmativo de una mayoría con poder de voto de la acciones en circulación de la Corporación tituladas para votar sobre ello, independiente de las disposiciones de la Sección 242(b)(2) de Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción ordinaria.* (a) *Emisión y Consideración.* Cualquiera Acción Ordinaria de tesorería o no emitida, puede emitirse para tal consideración según puede fijarse de acuerdo con la ley aplicable periódicamente por la Junta Directiva.

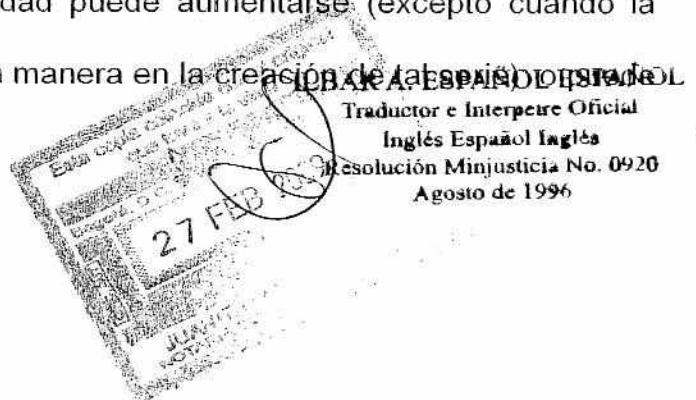


(b) *Dividendos*. Sujeto a los derechos de los titulares de las Acciones Preferenciales, los titulares de las Acciones Ordinarias tendrán derecho a recibir, cuando y cómo lo declare la Junta Directiva, de los recursos de la Corporación que por ley están disponibles para éllo, dividendos pagables o en dinero en efectivo, o en propiedades, o en acciones y los titulares de Acciones Preferenciales no tendrán derecho a participar de tales dividendos (a menos que la Junta Directiva lo disponga de otra manera mediante una resolución, estipulando la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCION 4.03. *Acciones Preferenciales*

(a) *Series y Límites de Variaciones entre las Series*. Cualquier acción de tesorería o no emitida de Acciones Preferenciales puede emitirse periódicamente en una o más series para tal consideración, según puede fijarse periódicamente por la Junta Directiva. Antes de la emisión de alguna serie particular de Acciones Preferenciales, se debe registrar un certificado ante la Secretaría de Estado de Delaware manifestando la designación, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones a ser adjuntas a las Acciones Preferenciales de tal serie y cualesquiera otros asuntos que sean requeridos, y la Junta Directiva fijará y determinará; y por la presente está expresamente facultada para fijar y determinar, en la manera prevista por la ley, los pormenores de las acciones de tal serie (en tanto que no sean inconsistentes con las disposiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluido, pero no limitado a lo siguiente:

(i) la designación característica de tal serie y el número de acciones que constituirán la misma, cuya cantidad puede aumentarse (excepto cuando la Junta Directiva lo disponga de otra manera en la creación de la serie).



disminuirse (pero no por debajo del número de acciones de las mismas entonces circulantes) periódicamente mediante acción similar de la Junta Directiva.

(ii) la tasa anual de dividendos pagables sobre acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales tales dividendos serán pagables y la fecha desde cuando los dividendos serán acumulativos; en tal evento la Junta Directiva determinará qué dividendos serán acumulativos;

(iii) si tal serie tendrá derecho a voto, además de los derechos de votación proporcionados por la ley, y si es así, las condiciones de tales derechos a voto;

(iv) si tal serie tendrá privilegios de conversión y, en ese caso, los términos y condiciones de tal conversión, incluido, pero no limitado a, disposiciones para el ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y en tal manera cómo lo determinará la Junta directiva;

(v) si o no, las acciones de tal serie serán redimibles y, en ese caso, los términos y condiciones de tal redención, incluso la fecha o fechas en o después de que ellas sean redimibles, y la cantidad pagable por acción en caso de redención, cuya cantidad puede variar bajo condiciones diferentes y en fechas diferentes de redención;

(vi) si tal serie tendrá un fondo de amortización para la redención o compra de acciones de esa serie y, en ese caso, las condiciones y cantidad de tal fondo de amortización;

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de liquidación voluntaria o involuntaria, disolución o liquidación de la Corporación, y los derechos de prioridad relativos, si los hay, de pago de acciones de esa serie; y



(viii) cualesquiera otros derechos relacionados preferencias y limitaciones de tal serie.

ARTÍCULO 5

SECCIÓN 5.01. *Modificación de los Estatutos por los Directores.* (a.) En apoyo y no en limitación a los poderes conferidos por el estatuto, la Junta Directiva está autorizada expresamente para formular, modificar, corregir, derogar, y rescindir los estatutos de la Corporación, sujeto a las Secciones 5.01(b) y 5.01(c) del presente.

(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, y 5.06, de los estatutos sólo pueden ser modificados, corregidos, derogados, o rescindidos mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultados para votar sobre ello y que representen más del 60% de las acciones tituladas para votación sobre las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos sólo pueden modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse, mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario titulados para votar sobre ello, y que representen más del 90% de las acciones tituladas para votación sobre las mismas.

SECCIÓN 5.02. *Modificación del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación sólo puede modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse, mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultado para Votar sobre ella, que representen más del 60% de

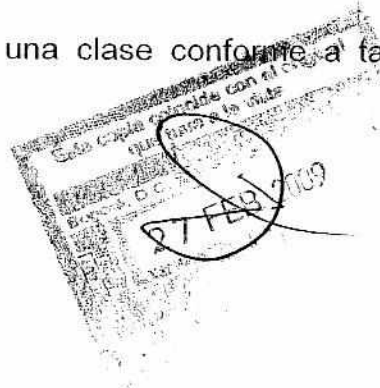


las acciones tituladas para ser votado sobre ello. La sección 5.01 (c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación sólo pueden modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultado para votar sobre ello, que representen más del 90% de las acciones tituladas para ser votado sobre ello.

ARTÍCULO 6

SECCIÓN 6.01 - *Elección de Directores por los Titulares de Acciones Preferenciales.*

Durante cualquier período cuando los titulares de alguna Acción Preferencial o una o más series de las mismas, votando como una clase, sean titulados para elegir un número específico de directores, por razón de dividendos vencidos u otras disposiciones otorgándoles el derecho para hacerlo, entonces y durante ese periodo de tiempo mientras continúe el derecho (i) el entonces autorizado número de directores se aumentará por tal número especificado de directores, y los titulares de tales Acciones Preferenciales o tal serie de las mismas, votando como una clase, se facultarán para elegir a los directores adicionales previstos, de conformidad con las disposiciones de tal Acción Preferencial o serie; (ii) cada director adicional desempeñará el cargo durante tal término y tendrá tales poderes de votación como sea expresado en las disposiciones relacionadas con las Acciones Preferenciales o serie; y (iii) cuando los titulares de alguna Acción Preferencial o serie de las mismas son despojados de tales derechos para elegir un número específico de directores, votando como una clase, conforme a las disposiciones de tal Acción Preferencial o serie, los periodos del cargo de todos los directores elegidos por los titulares de Acciones Preferenciales o serie, votando como una clase conforme a tales



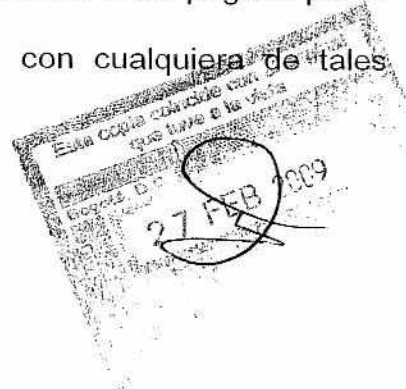
disposiciones, o eligieron llenar alguna vacante resultante de la muerte, dimisión o remoción de directores elegidos por los titulares de Acciones Preferenciales o serie, terminará inmediatamente y el número autorizado de directores por consiguiente, se reducirá.

SECCIÓN 6.02. *Papeletas de votación.* Las elecciones de directores en una asamblea anual o especial no necesitan ser mediante papeletas escritas, a menos que los estatutos de la Corporación lo dispongan de otra manera.

SECCIÓN 6.03. *Eliminación de Cierta obligación Personal de los Directores.* (a.)

Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o ante sus accionistas por los daños y perjuicios por contravención de deberes fiduciarios monetarios como director, hasta el punto máximo permitido por la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y los herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quién era o es una parte o es amenazada ser hecha una parte a, o está involucrada en alguna amenaza, pendiente o a cumplirse, de acción, demanda o procedimiento, sea civil, penal, administrativo o investigativo, por causa del hecho que tal persona es o fue un director de la Corporación, o es o estuvo desempeñando un cargo a petición de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, empresa conjunta, fideicomiso u otra empresa, será indemnizada y será exonerada de responsabilidad por la Corporación, hasta el punto máximo permitido por la Ley de Delaware - El derecho a indemnización conferida en esta Sección 6.03 también incluirá el derecho a ser pagado por la Corporación por los gastos incurridos en relación con cualquiera de tales



procedimientos, anticipadamente a la disposición final, hasta el máximo punto autorizado por la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferida en esta Sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, mediante la acción de su Junta Directiva, proporcionar la indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta el alcance y hasta tal efecto como lo determine la Junta Directiva que sea apropiado y autorizado por la Ley de Delaware.

(d) La Corporación tendrá la facultad para adquirir y mantener seguros en nombre de cualquier persona que es o fue director, funcionario, empleado o agente, de la Corporación o es o estuvo desempeñando un cargo a petición de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente, de otra corporación, sociedad, empresa conjunta, fiduciaria u otra empresa; contra cualquier gasto, obligación o pérdida, incurrida por tal persona en cualquier capacidad o surgida de su status como tal, la Corporación tuviera o no la facultad para indemnizarlo contra tal obligación bajo la Ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán excluyentes de cualquier otro derecho el cual cualquier persona de otra manera pudiera tener o adquirir de ahora en adelante.

(f) Ni la modificación, corrección, derogación o rescisión, de esta Sección 6.03, ni la adopción de cualquier provisión de este Certificado de Incorporación o los Estatutos de la Corporación, tampoco, al alcance máximo permitido por la Ley de Delaware, cualquier modificación legal, eliminará o reducirá el efecto de esta Sección 6.03 con respecto de cualesquier actos u omisiones que ocurran antes de tal modificación, corrección, derogación, rescisión, adopción o modificación.



ARTÍCULO 7

SECCION 7.01. *Sección 203 de Ley de Delaware.* La Corporación por el presente, elige no ser regida por la Sección 203 de Ley de Delaware.

ARTÍCULO 8

SECCIÓN 8.01. *Relación con Roche.* En anticipación a que la Corporación deje de ser una subsidiaria totalmente propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se definió en la Sección 8.05) siga siendo accionista de la Corporación, y en anticipación a que la Corporación (como se definió en la sección 8.05) y Roche puedan involucrarse en similares o en las mismas actividades o líneas comerciales y tengan interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus continuas relaciones contractuales, corporativas y comerciales con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades inherentes a cualquier director quien desea y se esfuerza plenamente para satisfacer tales obligaciones fiduciarias del director, en la determinar el alcance total de tales obligaciones en una situación particular, las disposiciones de este Artículo 8 son expresadas para regular, definir y guiar la conducta de ciertos negocios de la Corporación por cuanto ellos pueden involucrar a Roche y a sus funcionarios y directores, y las facultades, derechos obligaciones y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con las mismas.

SECCIÓN 8.02. *Actividades Comerciales Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc - pueda de otro modo aceptar por escrito,



(a) Roche no tendrá una obligación de abstenerse, de comprometerse directa o indirectamente, en las mismas o similares actividades comerciales o líneas comerciales como la Corporación, y

(b) ni Roche ni ningún funcionario o director del mismo serán responsables ante la Corporación o ante sus accionistas por la trasgresión de cualquier deber fiduciario por causa de cualquiera de tales actividad de Roche o de la participación en ello de tal persona.

En caso que Roche tenga conocimiento de una transacción potencial o materia que pueda ser una oportunidad corporativa para Roche y la Corporación;

Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o ante sus accionistas por la trasgresión de cualquier deber fiduciario como accionista de la Corporación o persona controladora de un accionista por el hecho que Roche prosiga o adquiera tal oportunidad corporativa para sí misma, dirija tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad o no comunique la información referente, o no ofrezca tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCIÓN 8.03. *Oportunidades Corporativas*. En caso que un director, funcionario o empleado de la Corporación que también es director, funcionario o empleado de Roche, tenga conocimiento de una transacción potencial o material que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (si tal transacción potencial o material es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación), tal director, funcionario o empleado tendrá el privilegio de ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o a Roche, según tal director, funcionario o



empleado, lo juzgue apropiado bajo las circunstancias y a su entera discreción; y ningún director, funcionario o empleado, será responsable ante la Corporación o ante sus Accionistas por la infracción de cualquier deber fiduciario o deber de lealtad o falta de actuar en (o no opuesto a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de cualquier beneficio personal impropio por causa del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado, ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de la Corporación) o no comunicó la información referente a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para sí mismo o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica la información referente a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCIÓN 8.04. *Consentimiento Implícito de los Accionistas.* Cualquier persona o entidad comprando o adquiriendo algún interés en cualquier acción del capital accionario de la Corporación será considerada que ha tenido aviso de y ha consentido a las disposiciones de este Artículo 8.

SECCIÓN 8.05. *Definiciones.* Para los propósitos de este Artículo 8 y Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" significará la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, empresas conjuntas, asociaciones y otras entidades en las cuales la Corporación posea beneficiosamente (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones votantes en circulación, poder de voto o intereses de votación similares, y (ii) el término "**Roche**" significará Roche Holdings, Inc. y todas las corporaciones, sociedades, empresas conjuntas, asociaciones y otras entidades (diferentes de la



Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta Sección 8.05) que son las "**afiliadas**" (como se definió en la Norma 12b-2 bajo las Leyes de la Bolsa de Valores (Securities Exchange) de 1934, (según enmienda) de Roche Holdings, Inc.

SECCIÓN 8.06. *Terminación: Efecto Vinculante.* No obstante algo al contrario en este Certificado de Incorporación, las disposiciones anteriores de este Artículo 8 expirarán en la fecha cuando Roche deje de poseer Acciones Ordinarias que representen por lo menos el 5% del número de acciones circulantes de Acciones Ordinarias de la Corporación y ninguna persona que siendo director o funcionario de la Corporación, sea también director o funcionario de Roche. Tampoco tal expiración, ni la modificación, corrección, cambio o derogación, de cualquier provisión de este Artículo 8, tampoco la adopción de cualquier provisión de este Certificado de Incorporación Enmendado y Reformulado, inconsistente con cualquier provisión de este Artículo 8, eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 con respecto de cualquier asunto que ocurra o cualquier causa de acción, demanda o reivindicación que, pero para este Artículo 8, se acumulara o surgiera, antes de tal expiración, modificación, corrección, revocación o adopción.

SECCIÓN 8.07. *Artículo 9.* Las disposiciones de este Artículo 8 son adiciones a las disposiciones del Artículo 9.

ARTÍCULO 9

SECCIÓN 9.01. *Acuerdos no Invalidados.* Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier corrección, modificación o terminación de ellos) entre



la Corporación y Roche será inválido, nulo o anulable, solamente por la razón que Roche es una de las partes de ellos o solamente porque algunos directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados con Roche, están presentes en o participan en la asamblea de la Junta Directiva o comité de los mismos, lo cual autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, corrección, modificación o terminación, o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito; pero tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier corrección, modificación o terminación de los mismos) se regirá por las disposiciones de estos Estatutos de la Corporación Modificados y Reformulados, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y alguna otra ley aplicable. Para los propósitos de este Artículo 9, las expresiones la "Corporación" y "Roche" tienen los significados manifestados en la Sección 8.05.

SECCIÓN 9.02. *Quórum*. Los Directores de la Corporación que también son directores o funcionarios de Roche pueden ser contabilizados en la determinación de la presencia de un quórum en una asamblea de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba algún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o corrección, modificación o terminación del mismo). Las Acciones Circulantes Ordinarias poseídas por Roche pueden contabilizarse para la determinación de la presencia de un quórum en una asamblea de accionistas que autoriza o aprueba cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o corrección, modificación o terminación del mismo).

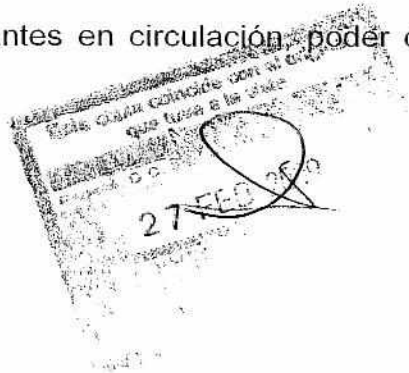


ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Ministerial N.º. 2000

SECCIÓN 9.03 - *Ninguna Responsabilidad Por Actividades de Buena Fe.* Roche ni cualquier funcionario o director será responsable ante la Corporación o ante los accionistas para la infracción de cualquier deber fiduciario o deber de lealtad o falta para actuar en (o no opuesto a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de cualquier beneficio personal impropio por el hecho de que Roche o algún funcionario o director del mismo, emprende cualquier acción o ejerce algunos derechos o entrega o retiene de buena fe cualquier aprobación en relación con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto sufragado u otra acción tomada por alguna persona que es director, funcionario u otro representante de Roche, cuyo voto es sufragado o tal persona emprende una acción en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho por o un consentimiento de Roche para los efectos de algún acuerdo o contrato.

SECCIÓN 9.04. *Consentimiento Implícito de los Accionistas.* Cualquier persona o entidad comprando o adquiriendo algún interés en cualquier acción del capital accionario de la Corporación será considerada que ha tenido aviso de y ha consentido a las disposiciones de este Artículo 9.

SECCIÓN 9.05 - *Contratos Protegidos.* Para los propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o con cualquier corporación, sociedad, empresa conjunta, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posea beneficios (directa o indirectamente) del cincuenta por ciento o más de la acciones votantes en circulación, poder de



voto o intereses de votación similares, se juzgará ser un contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación.

SECCIÓN 9.06. *Efecto Vinculante.* Ni la modificación, corrección, cambio o derogación de cualquier provisión de este Artículo 9, tampoco la adopción de cualquier provisión inconsistente con cualquier provisión de este Artículo 9, eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 con respecto de cualquier asunto que ocurra o cualquier causa de acción, demanda o reivindicación que, pero para este Artículo 9, se acumulara o surgiera, antes de tal alteración, modificación, cambio, revocación o adopción.

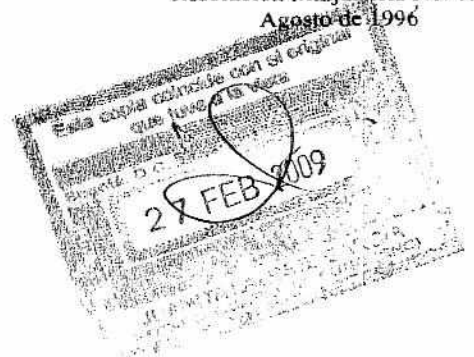
SECCIÓN 9.07. *Artículo 8.* Las disposiciones de este Artículo 9 son en adición a las disposiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado, habiendo sido debidamente adoptado de acuerdo con las Secciones 242 y 245 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware y por el consentimiento escrito del único accionista de la Corporación de acuerdo con la Sección 228 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, ha sido otorgado este día veintidós (22) de Julio, 1999.

GENENTECH, INC.

Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título; Vicepresidente Senior.
Asesor General y Secretario.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



Traducción Oficial N° 10-31-194

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265284**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Illegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

174488

T. Lav. Espinal
CUTY FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE REALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO DE MODIFICACION DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA QUINCE (15) DE MAYO DEL AÑO 2000, A LAS 5:00 P.M.

Firma (ilegible)

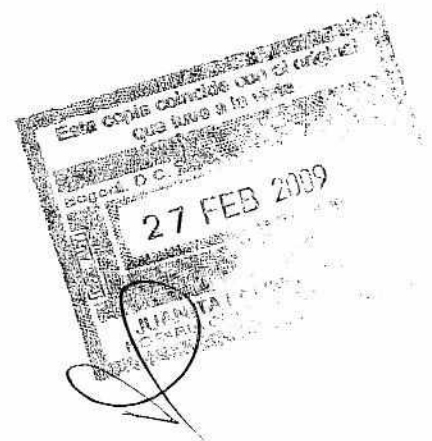
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212781

FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office, Delaware"


ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



**CERTIFICADO DE MODIFICACION
DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO**

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario*. (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de setecientos millones



(700.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Seiscientos millones (600.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día quince (15) de Mayo, año 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL

Traductor e Interpretre Oficial

Inglés Español Inglés

Resolución Ministerial No. 0920



Traducción Oficial N° 10-31-195

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

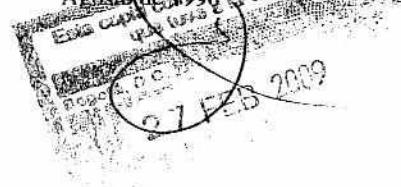
CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
 6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
 7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
 8. Número: **0265285**
 9. Sello/Estampilla
 10. Firma: (Ilegible)
- Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial

Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No 0920
Agosto de 1996



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERNALES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

117448
J. Ibarra Espand
CUIVA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTANA DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO MODIFICADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA DIEZ (10) DE MAYO DEL AÑO 2001, A LAS 2:05 P.M.

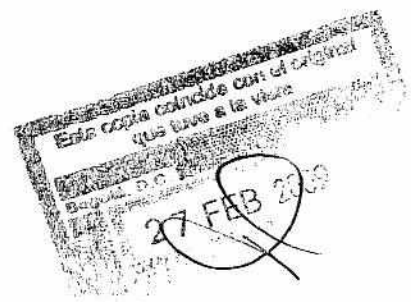
Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212782

FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office – Delaware"


ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



**CERTIFICADO DE MODIFICACION
DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO**

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario*. (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de mil trescientos millones



(1.300.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Un mil doscientos millones (1.200.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción Ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día diez (10) de Mayo, año 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



Traducción Oficial N° 10-31-196

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: 0265286
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Ago 20 de 1996



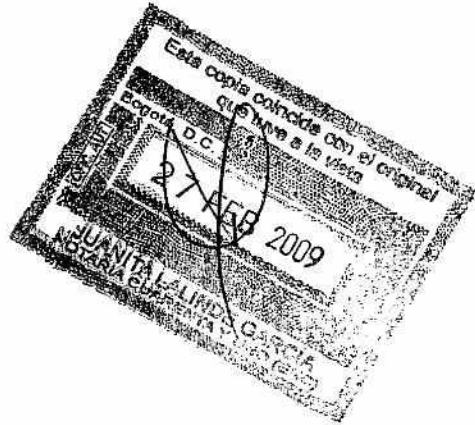
MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

174490
Ibarra Especial
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

2005 OCT 31 A 11:00

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.



DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO MODIFICADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA DIEZ Y SEIS (16) DE ABRIL DEL AÑO 2004, A LAS 7:39 P.M.

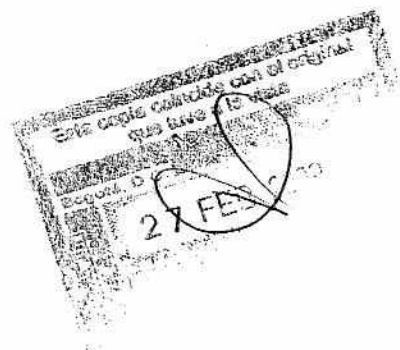
Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212783

FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office – Delaware"


ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



**CERTIFICADO DE TERCERA MODIFICACION
DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO**

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

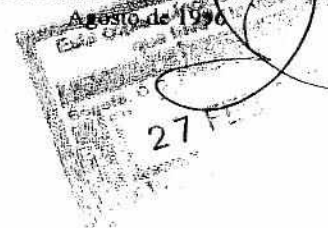
POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario*. (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de tres mil cien millones

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minijusticia No/0920
Agosto de 1996



(3.100.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3.000.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de \$0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción Ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día diez y seis (16) de Abril, año 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

ILBARA A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

27F

State of California



SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: *United States of America*
This public document
2. *has been signed by TERI LEE*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of TERI LEE, Notary Public,*
State of California

CERTIFIED

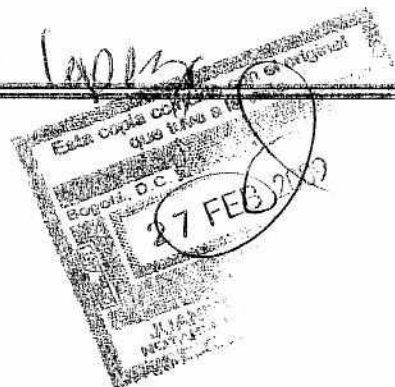
5. *At Sacramento, California*
6. *the 3rd day of October 2005*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 258054*
9. *Seal/Stamp:*

10. *Signature*

Bruce McShane

Secretary of State

M. Lopez



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of

San Mateo

SS.

On

9/13/2005

Date

before me,

Teri Lee, Notary Public

Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")

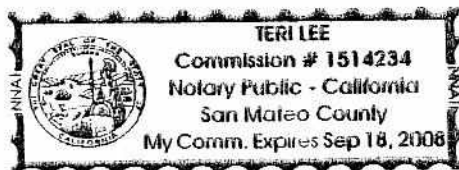
personally appeared

Timothy R. Schwartz

Name(s) of Signer(s)

☒ personally known to me

☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence



to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies); and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Teri Lee
Signature of Notary Public

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document:

Columbia Power

Document Date:

9/13/2005

Number of Pages:

1

Signer(s) Other Than Named Above:

None

Capacity(ies) Claimed by Signer

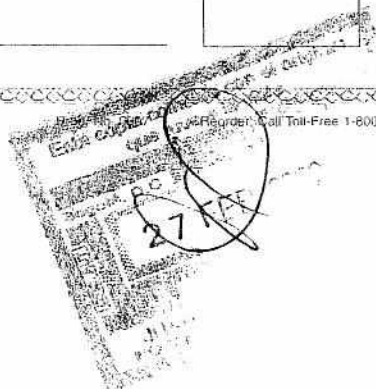
Signer's Name: _____

- ☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER

Top of thumb here



Los abajo firmados,

GENENTECH, INC.

Una sociedad organizada y existente
bajo las leyes del Estado de Delaware
Estados Unidos de America.

con domicilio en

1 DNA way

South San Francisco, CA 94080, USA

The undersigned,

Genentech, Inc

A Corporate organized and existing under t
domiciled at laws od State of Delaware , E.U.A

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080, USA

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o
GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA
y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá,
Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No.
5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y
verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir
notificaciones y nombrar apoderados judiciales o
extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al
parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de
1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO
TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE
ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos
designé, quedan especialmente facultados para
representarnos ante las autoridades colombianas,
administrativas, judiciales o de policía, en todos los
trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo
efecto les facultamos para dar ante dichas
autoridades todos los pasos necesarios al objeto
indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos,
recursos y presentar desistimientos; formular
descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las
solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones;
instaurar cancelaciones, renunciar total o
parcialmente a los registros, abonar todos los
impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago
determinado por la ley; recibir todos los documentos
y valores, dando el descargo respectivo; llenar
cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas
las medidas que creyeren conducentes al resguardo
de nuestros intereses; y en caso de producirse
oposición, pasando los antecedentes a los
tribunales, quedan facultados para tomar
intervención como demandantes o demandados ante
los jueces que sean competentes, pudiendo transar,
someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con
todas las demás facultades que resulten necesarias,
y por el presente declaramos desde ahora válido y
bueno cuanto dichos representantes y/o los
apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren
en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA
LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO
SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para
solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la
protocolización de este documento y de cualquier
poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre
nuestro.

Dado y firmado a los 13 días de Sep. 2005

Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Section Patent Counsel
Genentech, Inc.
Authorized Corporate Signatory

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or
GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO
SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of
Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72
No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal
representatives in Bogotá, with power to receive
notifications and to appoint judicial or extrajudicial
agents, so as to comply with paragraph 1o. of article
543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO
TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or
ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of
them appointed, are especially empowered to
represent us before the administrative, judicial or
police authorities of Colombia, in all proceedings
pertaining to industrial property, for which purpose
we authorize them to take before the said authorities
all the necessary steps for the said end; to file
petitions, declarations, claims, recourses and
withdrawals, to draw up specifications; to file
amendments, to limit the scope of applications, file
oppositions; file cancellations total or partially waive
registrations, to pay all installments and effect all
other payments prescribed by law; to receive proper
receipts, to comply with all other requirements and, in
short, to take all those measures which they may
deem fit for the protection of our interests; and in
case of opposition, where the proceedings be passed
over to the courts, we authorize said agents to act on
our behalf, as complainants as well as defendants,
before the competent judges, with full powers to
make arrangements, to submit to arbitrators, to
desist, to collect, to appeal and, in short, with all such
further powers as may be required, and we hereby
declare from now on as valid and good all that said
representatives and/or the agents by any one of them
appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA
and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO
SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply
for protocolization of this document and of any power
of attorney by any one of them conferred in our
name, before the Office of Industrial Property.

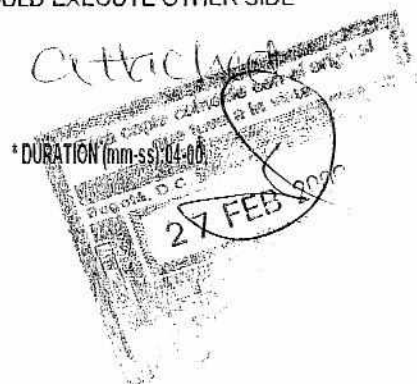
Given and signed this

13 Sept 2005



NOTA RY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

See Attached



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265282

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "GENENTECH, INC." IS DULY INCORPORATED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL CORPORATE EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE SEVENTH DAY OF OCTOBER, A.D. 2005.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE SAID "GENENTECH, INC." WAS INCORPORATED ON THE TWENTY-THIRD DAY OF DECEMBER, A.D. 1986.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE ANNUAL REPORTS HAVE BEEN FILED TO DATE.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE FRANCHISE TAXES HAVE BEEN PAID TO DATE.

2112549

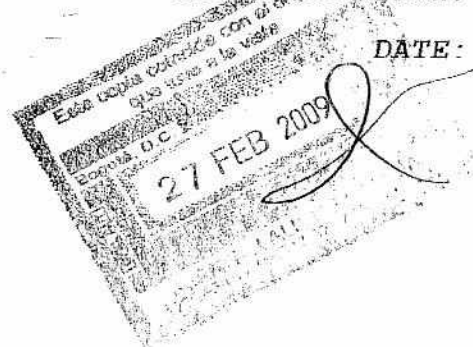
050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 4212779

DATE: 10-07-05



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

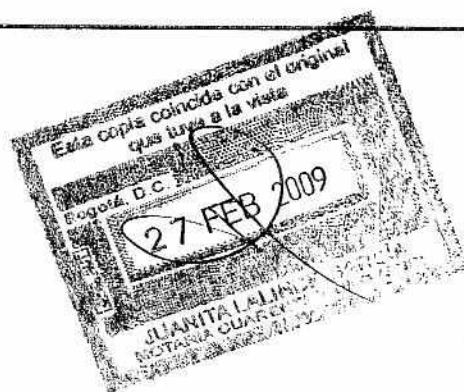
8. No. 0265283

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.

2112549

050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 421-780



AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "Corporation"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("Delaware Law").

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 09:00 AM 07/22/1999
9913023 112549



ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

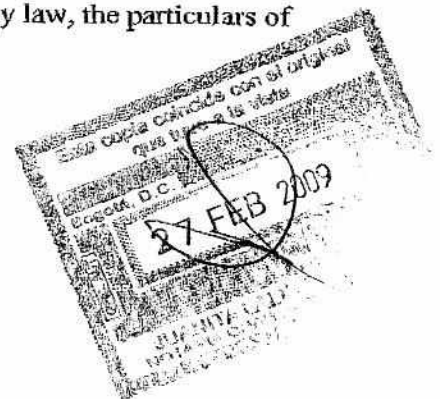
(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of



the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

(i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;

(ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;

(iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;

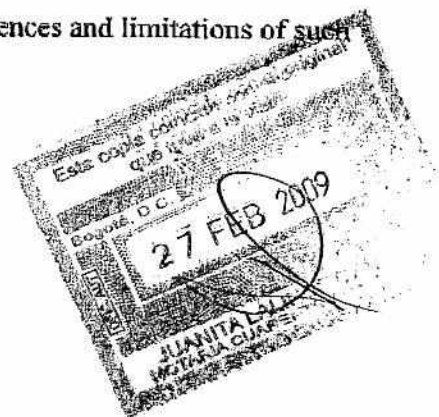
(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;

(vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;

(vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and

(viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.



ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

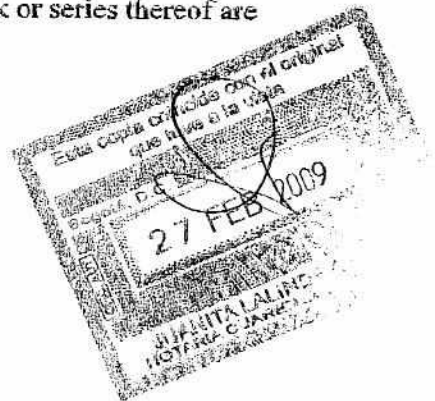
(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are



divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

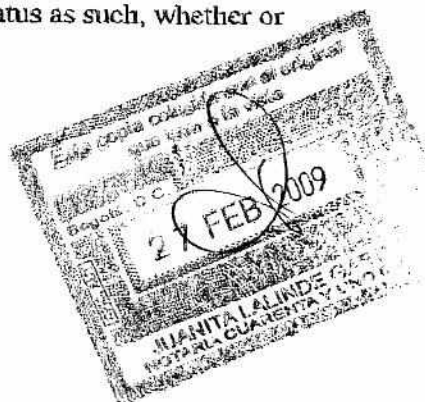
SECTION 6.02. *Ballots.* Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors.* (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or



not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

(f) Neither the alteration, amendment, repeal or rescission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, rescission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities



of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

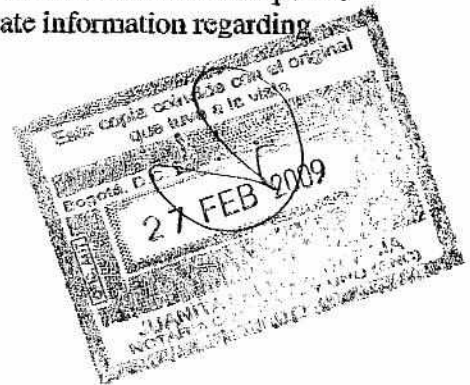
SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities.* In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.



SECTION 8.04. *Deemed Consent of Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

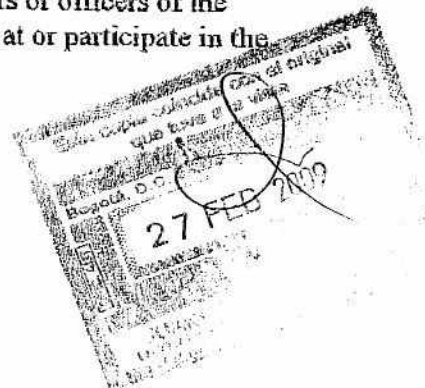
SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term "Corporation" shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term "Roche" shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are "affiliates" (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. *Termination; Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. *Article 9.* The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. *Contracts Not Void.* No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the



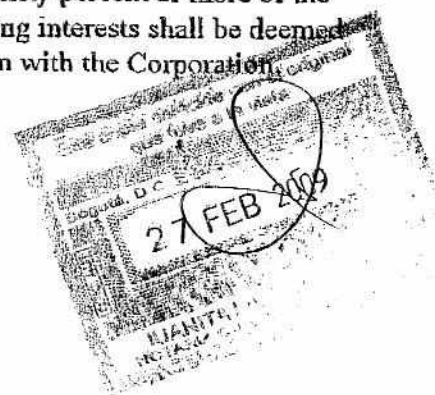
meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "Corporation" and "Roche" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions.* Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer or director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.



SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.



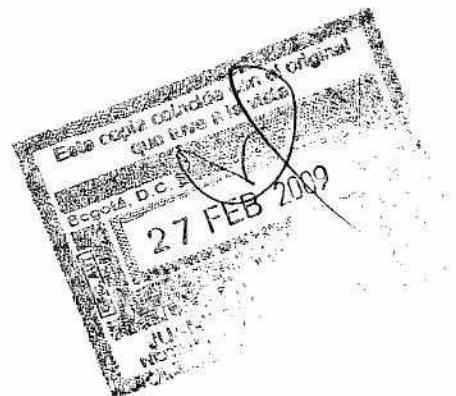
IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

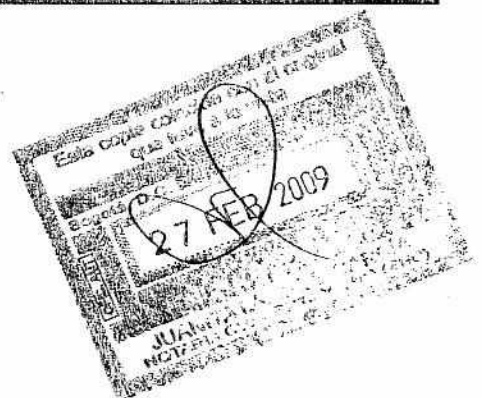
8. No. 0265284

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.

2112549

050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 4212781

DATE: 10-07-05



CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary

75841



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0265285

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.

2112549

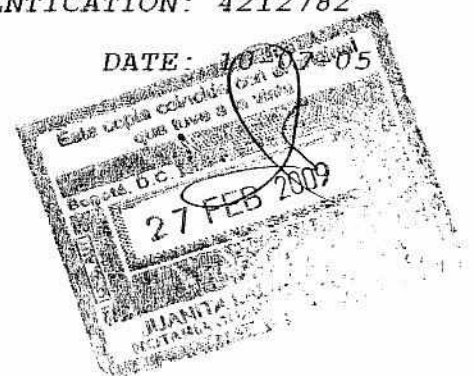
050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 4212782

DATE: 10-27-05



CERTIFICATE OF AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

"Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

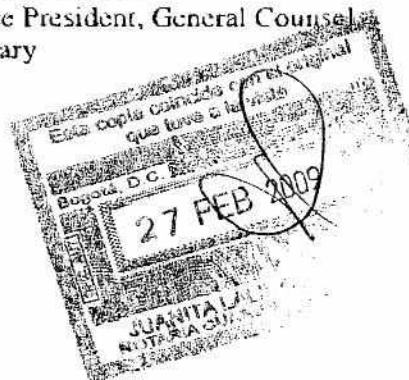
THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By: Stephen Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel
and Secretary



Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the seventh day of October, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

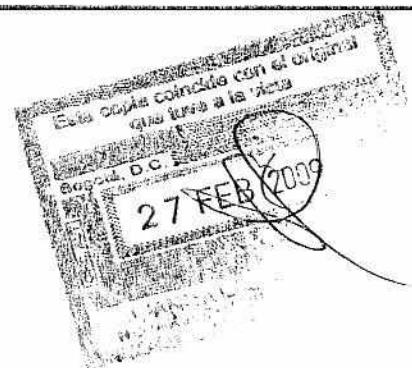
8. No. 0265286

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

PAGE 1

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.

2112549

050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 4212783

DATE: 10-07-05



CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT
OF AMENDED AND RESTATED
CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value \$0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value \$0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

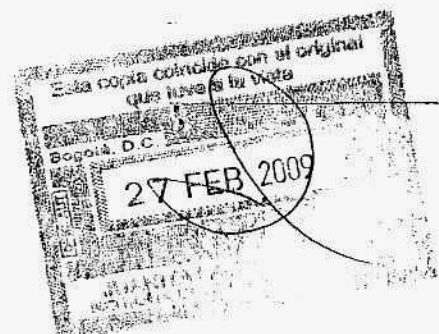
FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

GENENTECH, INC.

By: 
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Executive Vice President, General Counsel
and Secretary

#153087



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 09-033.096 A		(51) Int Cl: A61K 38/20	
(22) Fecha de solicitud: 31-03-09		(71) Solicitante(s): GENENTECH, INC.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 11/606,192	(32) Fecha 29-11-06	(33) País US
		(72) Inventor(es): GURNEY, Austin, L.; BALAZS, Mercedesz; GHILARDI, Nico; HYMOWITZ, Sarah; HASS, Philip, E.; STAROVASNIK, Melissa, A.; WU, Yan; LEE, James, M.; ARNOTT, David, P. y OUYANG, Wenjun.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85)	Fecha límite inicio fase nacional: 29-06-09	(87)	Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha:	05-06-08
	Fecha de presentación de la solicitud: 20-11-07	N° publicación:	WO 2008/067223 A3
	No. de solicitud: PCT/US2007/085269		
(54) Título: POLIPÉPTIDOS HETERODIMERICOS IL-17A/F			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Uso de uno o más anticuerpos antagonistas capaces de inhibir tanto IL-17A (SEQ ID NO: 3) e IL-17F (SEQ ID NO: 4), en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno relacionado con lo inmune en un mamífero que necesita del mismo, en donde dicho trastorno relacionado con lo inmune es esclerosis múltiple (MS) o artritis reumatoide (RA).

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____	
(21) N° de solicitud: 09-033.096 A		(22) Fecha de solicitud: 31-03-09	
(51) Clasificación Internacional: A61K 38/20			
(71) Solicitante(s): GENENTECH, INC.			
(72) Inventor(es): GURNEY, Austin, L.; BALAZS, Mercedesz; GHILARDI, Nico; HYMOWITZ, Sarah; HASS, Philip, E.; STAROVASNIK, Melissa, A.; WU, Yan; LEE, James, M.; ARNOTT, David, P. y OUYANG, Wenjun.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 11/606,192	(32) Fecha 29-11-06	(33) País US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 29-06-09		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 20-11-07 No. de solicitud: PCT/US2007/085269		Fecha: 05-06-08 No. Publicación : WO 2008/067223 A3	
(54) Título: POLIPÉPTIDOS HETERODIMERICOS IL-17A/F			
(57) Resumen: Reivindicación número 1.- Uso de uno o más anticuerpos antagonistas capaces de inhibir tanto IL-17A (SEQ ID NO: 3) e IL-17F (SEQ ID NO: 4), en la fabricación c un medicamento para tratar un trastorno relacionado con lo inmune en un mamífero que necesita del mismo, en donde dicho trastorn relacionado con lo inmune es esclerosis múltiple (MS) o artritis reumatoide (RA).			

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____	
(21) N° de solicitud: 09-033.096 A		(22) Fecha de solicitud: 31-03-09	
(51) Clasificación Internacional: A61K 38/20			
(71) Solicitante(s): GENENTECH, INC.			
(72) Inventor(es): GURNEY, Austin, L.; BALAZS, Mercedesz; GHILARDI, Nico; HYMOWITZ, Sarah; HASS, Philip, E.; STAROVASNIK, Melissa, A.; WU, Yan; LEE, James, M.; ARNOTT, David, P. y OUYANG, Wenjun.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 11/606,192	(32) Fecha 29-11-06	(33) País US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 29-06-09		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 20-11-07 No. de solicitud: PCT/US2007/085269		Fecha: 05-06-08 N° publicación: WO 2008/067223 A3	
(54) Título: POLIPÉPTIDOS HETERODIMERICOS IL-17A/F			

POLIPÉPTIDOS HETERODIMERICOS IL-17A/F

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5 La presente invención se dirige a una citoquina humana
novedosa que se presenta naturalmente que comprende un
heterodímero de interleucina 17 e interleucina 17F designada
en la presente como interleucina 17A/F (IL-17A/F). También se
proporcionan en la presente vectores y células hospederas que
10 comprenden esas secuencias de ácidos nucleicos, moléculas
quiméricas de polipéptidos que comprenden los polipéptidos de
la presente invención fusionadas a las secuencias heterólogas
de polipéptidos, anticuerpos específicos los cuales se
enlazan a los polipéptidos de la presente invención y a
15 métodos de producción de los polipéptidos de la presente
invención. Se proporcionan además métodos para el tratamiento
de trastornos degenerativos de los cartílagos y otras
enfermedades inflamatorias.

POLIPÉPTIDOS HETERODIMERICOS IL-17A/F

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere generalmente a la identificación y aislamiento de una citoquina novedosa humana designada en la presente como interleucina-17A/F (IL-17A/F).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

Las proteínas extracelulares juegan papeles importantes en, entre otras cosas, la formación, diferenciación y mantenimiento de los organismos multicelulares. El destino de muchas de las células individuales, *por ejemplo*,
15 proliferación, migración, diferenciación o interacción con otras células, está típicamente gobernado por la información recibida de otras células y/o el ambiente inmediato. Esta información se transmite a menudo por los polipéptidos segregados (por ejemplo, factores mitogénicos, factores de
20 supervivencia, factores citotóxicos, factores de diferenciación, neuropéptidos, y hormonas) los cuales, a su vez, se reciben e interpretan por diversos receptores de células o proteínas de enlace a la membrana. Estos polipéptidos segregados o moléculas de señalización pasan

normalmente a través de la trayectoria celular secretora para alcanzar su sitio de acción en el ambiente extracelular.

Las proteínas secretadas tienen diversas aplicaciones industriales, que incluyen como farmacéuticos, productos de diagnóstico, biosensores y bioreactores. La mayoría de los fármacos de proteínas disponibles en la actualidad, tales como agentes trombolíticos, interferones, interleucinas, eritropoietinas, factores estimuladores de colonias, y diversas otras citoquinas, son proteínas secretoras. Sus receptores, los cuales son proteínas de membrana, también tienen potencial como agentes terapéuticos y de diagnóstico.

Las proteínas de enlace a la membrana y los receptores pueden jugar papeles importantes en, entre otras cosas, la formación, diferenciación y mantenimiento de los organismos multicelulares. El destino de muchas células individuales, *por ejemplo*, proliferación, migración, diferenciación o interacción con otras células, está típicamente gobernado por la información recibida de otras células y/o el ambiente inmediato. Esta información se transmite a menudo por los polipéptidos secretados (por ejemplo, factores mitogénicos, factores de supervivencia, factores citotóxicos, factores de diferenciación, neuropéptidos y hormonas) los cuales a su vez, se reciben e interpretan por los diversos receptores celulares o proteínas enlazadas a la membrana. Tales proteínas enlazadas a la membrana y receptores celulares

incluyen, pero no se limitan a, receptores de citoquinas, cinasas receptoras, fosfatasas receptoras, receptores involucrados en las interacciones de célula a célula, y moléculas de adhesina celular como las selectinas e integrinas. Por ejemplo, la transducción de señales que regulan el crecimiento y diferenciación celular se regula en parte por la fosforilación de diversas proteínas celulares. Las proteínas de tirosina cinasas, enzimas que catalizan ese proceso, pueden actuar como receptores del factor de crecimiento. Ejemplos incluyen receptor del factor de crecimiento de fibroblastos y el receptor del factor de crecimiento de nervios.

Similarmente a las proteínas secretadas, las proteínas enlazadas a la membrana y moléculas del receptor tienen diversas aplicaciones industriales, incluyendo como agentes farmacéuticos y de diagnóstico. Las inmunoadhesinas del receptor, por ejemplo, se pueden emplear como agentes terapéuticos para bloquear las interacciones del ligando-receptor. Las proteínas enlazadas a la membrana también se pueden emplear para seleccionar un péptido potencial o inhibidores de molécula pequeña de la interacción relevante de receptor/ligando.

Se han tenido esfuerzos tanto por la industria como por la academia para identificar nuevas proteínas secretadas nativas y receptor nativo o proteínas enlazadas a la

membrana. Muchos esfuerzos se enfocan en la selección de genotecas de ADN recombinante de mamíferos para identificar las secuencias de codificación para proteínas novedosas secretadas. Ejemplos de métodos y técnicas de selección se describen en la literatura [ver, por ejemplo, Klein *et al.*,
5 Proc. Natl. Acad. Sci., 93:7108-7113 (1996); patente de E.U.A. No. 5,536,637)].

A este respecto, la presente invención se refiere a la identificación de polipéptidos novedosos secretados de la familia de la interleucina 17 (IL-17) los cuales han
10 demostrado relacionarse con la enfermedad inflamatoria y mediada por lo inmune, Las enfermedades inflamatorias y mediadas por lo inmune son la manifestación o consecuencia de trayectorias biológicas múltiples a menudo interconectadas, bastante complejas, las cuales son críticas en la fisiología
15 normal para responder a una lesión o herida, iniciar la reparación de la lesión o herida, y montar una defensa innata y adquirida contra organismos externos. La enfermedad o patología se presenta cuando estas trayectorias fisiológicas normales provocan lesión o herida ya sea cuando se relacionan
20 directamente con la intensidad de la respuesta, como una consecuencia de la regulación anormal o estimulación excesiva, como una reacción a sí misma, o como una combinación de estas.

Aunque la génesis de estas enfermedades involucra a menudo trayectorias multi-etapa y a menudo sistemas/trayectorias múltiples diferentes, la intervención en los puntos críticos en una o más de estas trayectorias puede tener un efecto terapéutico o mejorador. La intervención terapéutica puede suceder ya sea por antagonismo de un proceso/trayectoria perjudicial o la estimulación de un proceso/trayectoria benéfico.

Muchas enfermedades relacionadas con lo immune se conocen y se han estudiado ampliamente. Tales enfermedades incluyen enfermedades inflamatorias mediadas por lo inmune (tales como artritis reumatoide, enfermedad renal mediada por lo inmune, enfermedades hepatobiliares, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), psoriasis, y asma), enfermedades inflamatorias no mediadas por lo inmune, enfermedades infecciosas, enfermedades de inmunodeficiencia, neoplasia, etc.

Los linfocitos "T" (células T) son un componente importante de la respuesta inmune de los mamíferos. Las células T reconocen antígenos los cuales se asocian con una auto-molécula codificada por los genes dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). El antígeno puede desplegarse junto con las moléculas MHC sobre la superficie de las células que presentan antígenos, células infectadas por virus, células de cáncer, injertos, etc. El sistema de

las células T elimina estas células alteradas las cuales plantean una amenaza para la salud para el mamífero hospedero. Las células T incluyen células T auxiliares y células T citotóxicas. Las células T auxiliares proliferan
5 ampliamente después del reconocimiento de un complejo antígeno-MHC sobre una célula que presenta antígenos. Las células T auxiliares también segregan una variedad de citoquinas, esto es, linfocinas, las cuales juegan un papel central en la activación de las células B, células T
10 citotóxicas y una variedad de otras células las cuales participan en la respuesta inmune.

Un evento central tanto en las respuestas inmunes mediadas por células y humorales es la activación y expansión clonal de las células T auxiliares. La activación de las
15 células T auxiliares se inicia por la interacción del complejo del receptor de células T (TCR)-CD3 con un antígeno-MHC sobre la superficie de una célula que presenta antígenos. Esta interacción media una cascada de eventos bioquímicos que inducen a la célula T auxiliar en reposo, a
20 entrar en un ciclo celular (la transición de G0 a G1) y resulta en la expresión de un receptor de alta afinidad para IL-2 y algunas veces IL-4. La célula T activada avanza a través del ciclo al proliferar y diferenciar en células de memoria o células efectoras.

Además de las señales mediadas a través de la TCR, la activación de células T involucra la coestimulación adicional inducida por citoquinas liberadas por la célula que presenta antígenos o a través de interacciones con moléculas que se
5 enlazan a membranas sobre la célula que presenta antígenos y la célula T. Las citoquinas IL-1 e IL-6 han demostrado suministrar una señal coestimuladora. También, la interacción entre la molécula B7 expresada sobre la superficie de una célula que presenta antígenos y las moléculas CD28 y CTLA-4
10 expresadas sobre la superficie de células T, afectan la activación de las células T. Las células T activadas expresan un número creciente de moléculas de adhesión celular, tales como ICAM-1, integrinas, VLA-4, LFA-1, CD56, etc.

La proliferación de células T en un cultivo mixto de
15 linfocitos o reacción mixta de linfocitos (MLR) es una indicación establecida de la capacidad de un compuesto para estimular el sistema inmune. En muchas respuestas inmunes, las células inflamatorias infiltran el sitio de la lesión o infección. Las células migrantes pueden ser neutrofílicas, eosinofílicas, monolíticas o linfocíticas como se puede
20 determinar por el examen histológico de los tejidos afectados. Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

Las enfermedades relacionadas con lo inmune se pueden
25 tratar al suprimir la respuesta inmune. Al usar anticuerpos

neutralizantes que inhiben moléculas que tienen actividad estimuladora inmune sería benéfico en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y mediadas por lo inmune. Las moléculas que inhiben la respuesta inmune se pueden utilizar
5 (proteínas directamente o por medio del uso de agonistas de anticuerpos) para inhibir la respuesta inmune y así aminorar la enfermedad relacionada con lo inmune.

La interleucina 17 (IL-17) es una molécula pro-inflamatoria derivada de células T que estimula las células
10 epiteliales, endoteliales y fibroblásticas, para producir otras citoquinas y quimiocinas inflamatorias incluyendo IL-6, IL-8, G-CSF, y MCP-1 [ver, Yao, Z. et al., J. Immunol., 122(12):5483-5486 (1995); Yao, Z. et al., Immunity, 3(6):811-821 (1995); Fossiez, F., et al., J. Exp. Med., 183(6): 2593-
15 2603 (1996); Kennedy, J., et al., J. Interferon Cytokine Res., 16(8):611-7 (1996); Cai, X. Y., et al., Immunol. Lett., 62(1):51-8 (1998); Jovanovic, D.V., et al., J. Immunol., 160(7):3513-21 (1998); Laan, M., et al., J. Immunol., 162(4):2347-52 (1999); Linden, A., et al., Eur Respir J,
20 15(5):973-7 (2000); y Aggarwal, S. and Gurney, A.L., J Leukoc Biol, 71(1):1-8 (2002)]. IL-17 también hace sinergia con otras citoquinas incluyendo TNF- α e IL-1 β para inducir además la expresión de quimiocinas (Chabaud, M., et al., J. Immunol. 161(1):409-14 (1998)). La interleucina 17 (IL-17) muestra
25 actividades biológicas pleiotrópicas en diversos tipos de

células. La IL-17 también tiene la capacidad de inducir la expresión en superficie de ICAM-1, proliferación de células T, y el crecimiento y diferenciación de progenitoras humanas CD34⁺ dentro de neutrófilos. La IL-17 también ha estado
5 implicada en el metabolismo de los huesos, y se ha sugerido que juega un papel importante en las condiciones patológicas caracterizadas por la presencia de células T activadas y la producción de TNF- α tales como artritis reumatoide y pérdida de la fijación en los implantes de huesos (Van Bezooijen *et al.*, J. Bone Miner. Res., 14: 1513-1521 [1999]). Las células
10 T activadas del tejido sinovial derivado de pacientes con artritis reumatoide se encontró que segrega mayores cantidades de IL-17 que aquellas derivadas de individuos normales o pacientes con osteoartritis (Chabaud *et al.*,
15 Arthritis Rheum., 42: 963-970 [1999]). Se sugirió que esta citoquina proinflamatoria contribuye activamente con la inflamación sinovial en la artritis reumatoide. Además de su papel proinflamatorio, la IL-17 parece contribuir con la patología de la artritis reumatoide todavía por otro
20 mecanismo. Por ejemplo, IL-17 se ha demostrado que induce la expresión del ARNm del factor de diferenciación de osteoclastos (ODF) en osteoblastos (Kotake *et al.*, J. Clin. Invest., 103: 1345-1352 [1999]). ODF estimula la diferenciación de células progenitoras en osteoclastos, las
25 células involucradas en la resorción del hueso. Ya que el

nivel de IL-17 se incrementa significativamente en el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, parece que la formación de osteoclastos inducida por IL-17 juega un papel crucial en la resorción del hueso en la artritis reumatoide.

5 La IL-17 también se cree que juega un papel clave en ciertos otros trastornos autoinmunes tales como esclerosis múltiple (Matusevicius et al., Mult. Scler., 5: 101-104 (1999); Kurasawa, K., et al., Arthritis Rheu 43(11):2455-63 (2000)) y psoriasis (Teunissen, M.B., et al., J Invest Dermatol
10 111(4):645-9 (1998); Albanesi, C., et al., J Invest Dermatol 115(1):81-7 (2000); y Homey, B., et al., J. Immunol. 164(12:6621-32 (2000)).

La IL-17 ha demostrado además, por señalización intracelular, que estimula la entrada de Ca^{2+} y una reducción
15 en $[\text{cAMP}]_i$ en macrófagos humanos (Jovanovic et al., J. Immunol., 160:3513 [1998]). Los fibroblastos tratados con IL-17 inducen la activación de NF- κ B, [Yao et al., Immunity, 3:811 (1995), Jovanovic et al., *supra*], mientras que los macrófagos tratados con ello, activan NF- κ B y las proteína
20 cinasas activadas con mitógeno (Shalom-Barek et al., J. Biol. Chem., 273:27467 [1998]). Adicionalmente, IL-17 también comparte similitud de secuencias con el factor 7 del tipo de citoquina de mamífero que se involucra en el crecimiento de hueso y cartílago. Otras proteínas con las
25 cuales los polipéptidos de IL-17 comparten similitud de

secuencias son el factor relacionado con la interleucina derivado del embrión (EDIRF) e interleucina 20.

Consistente con el amplio intervalo de efectos de IL-17, el receptor de la superficie celular para IL-17 se ha encontrado que se expresa ampliamente en muchos tejidos y tipos de células (Yao et al., Cytokine, 9:794 [1997]). Aunque la secuencia de aminoácidos del receptor humano IL-17 (IL-R) (866 aminoácidos) predice una proteína con un dominio de transmembrana sencillo y un dominio intracelular largo de 525 aminoácidos, la secuencia del receptor es única y no es similar a aquella de alguno de los receptores de la familia del receptor del factor de crecimiento/citoquina. Esto acoplado con la falta de similitud de IL-17 en sí mismo con otras proteínas conocidas indica que IL-17 y su receptor pueden ser parte de una familia novedosa de proteínas y receptores de señalización. Se ha demostrado que la actividad de IL-17 está mediada a través del enlace a su receptor particular de la superficie de la célula (designado en la presente como IL-17R humano), en donde los estudios previos han demostrado que poner en contacto las células T con una forma soluble del polipéptido del receptor IL-17 inhibió la proliferación de células T y la producción de IL-2 inducida por PHA, concanavalina A y anticuerpo monoclonal anti-TCR (Yao et al., J. Immunol., 155:5483-5486 [1995]). Como tal, hay un interés importante en identificar y

caracterizar polipéptidos novedosos que tienen homología con los receptores conocidos de citoquinas, específicamente receptores IL-17.

La interleucina 17 se reconoce ahora como el miembro
5 prototipo de una familia emergente de citoquinas. La formación de secuencias a gran escala de los genomas humano y de otros vertebrados, ha revelado la presencia de proteínas adicionales codificadoras de genes relacionadas claramente con IL-17, definiendo así una nueva familia de citoquinas.
10 Hay al menos 6 miembros de la familia IL-17 en humanos y ratones que incluyen IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E y IL-17F así como los receptores novedosos IL-17RH1, IL-17RH2, IL-17RH3 e IL-17RH4 (ver WO01/46420 publicada en junio 28, 2001). Uno de tales miembros IL-17 (designado como IL-17F) ha
15 demostrado enlazar al receptor humano IL-17 (IL-17R) (Yao et al., Cytokine, 9(11):794-800 (1997)). La caracterización inicial sugiere que, como IL-17, varias de estas moléculas recientemente identificadas tienen la capacidad de modular la función inmune. Las acciones inflamatorias potentes que se
20 han identificado por varios de estos factores, y las asociaciones emergentes con las principales enfermedades humanas, sugieren que estas proteínas pueden tener roles importantes en los procesos inflamatorios y pueden ofrecer oportunidades para la intervención terapéutica.

El gen que codifica IL-17F humana se localiza adyacente a IL-17 (Hymowitz, S.G., et al., Embo J, 20(19):5332-41 (2001)). IL-17 e IL-17F comparten un 44% de identidad de aminoácidos mientras que los otros miembros de la familia IL-17 comparten una identidad más limitada de aminoácidos del 15-27%, lo que sugiere que IL-17 e IL-17F forman un subgrupo diferente dentro de la familia IL-17 (Starnes, T., et al., J Immunol, 167(8):4137-40 (2001); Aggarwal, S. and Gurney, A.L., J. Leukoc Biol, 71(1):1-8 (2002)). IL-17F parece tener las acciones biológicas similares como IL-17, y puede promover la producción de IL-6, IL-8, y G-CSF a partir de una amplia variedad de células. Similar a IL-17, se puede inducir la liberación de la matriz de cartílago e inhibir la nueva síntesis de matriz de cartílago (ver US-2002-0177188-A1 publicada en noviembre 28, 2002). Así, como la IL-17, IL-17F puede contribuir potencialmente a la patología de los trastornos inflamatorios. Recientemente, estos autores han observado que ambas IL-17 y IL-17F se inducen en células T por la acción de la interleucina 23 (IL-23) (Aggarwal, S., et al., J. Biol. Chem., 278(3):1910-4 (2003)). La observación de que IL-17 e IL-17F comparten una localización cromosomal similar y una similitud de secuencia importante así como la observación de que IL-17 e IL-17F parecen estar inducidas con la misma población celular en respuesta a estímulos específicos, ha conducido a la identificación de una nueva

citoquina humana que comprende un heterodímero covalente de IL-17 e IL-17F (designado en la presente IL-17A/F). La IL-17A/F humana es una citoquina distintivamente nueva, que se diferencia de la IL-17 e IL-17F humanas tanto en la estructura de las proteínas como en los ensayos de actividad basados en células. A través del uso de IL-17A/F humano recombinante purificado como un estándar, se ha desarrollado un ELISA específico de IL-17AF humano. A través del uso de este ELISA específico, se detectó la expresión inducida de IL-17A/F humano, lo que confirma que IL-17A/F se produce naturalmente de células T humanas activadas en cultivo. De esta manera, IL-17A/F es una citoquina diferentemente nueva, detectable como un producto natural de células T humanas activadas y aisladas, cuya forma recombinante se ha caracterizado, tanto en ensayos de la estructura de las proteínas y de base celular, por ser diferentes y diferenciables de las citoquinas relacionadas. Así, estos estudios proporcionan e identifican un estimulante inmune novedoso (esto es, IL-17A/F) que puede reforzar el sistema inmune para responder a un antígeno particular que pueda no haber sido inmunológicamente activo previamente. Como tal, el estimulante inmune recientemente identificado tiene importantes aplicaciones clínicas. Esta citoquina novedosa IL-17A/F o agonistas de las mismas, encontrarían por lo tanto utilidad práctica como un estimulante inmune, mientras que

las moléculas las cuales inhiben la actividad de IL-17A/F (antagonistas) se esperaría que encontraran utilidad práctica cuando sea deseable una inhibición de la respuesta inmune, tal como en enfermedades autoinmunes. Específicamente, los anticuerpos para esta nueva citoquina los cuales ya sea imitan (anticuerpos agonistas) o inhiben (anticuerpos antagonistas) las actividades inmunológicas de IL-17A/F poseerían cualidades terapéuticas. Las moléculas pequeñas las cuales actúan para inhibir la actividad de esta citoquina novedosa también tendrían usos potenciales terapéuticos.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

A. Realizaciones

La presente invención se refiere a composiciones y métodos útiles para el diagnóstico y tratamiento de enfermedad relacionada con lo inmune en mamíferos, incluyendo humanos. La presente invención se basa en la identificación de proteínas (incluyendo anticuerpos agonistas y antagonistas) los cuales ya sea estimulan o inhiben la respuesta inmune en mamíferos. Las enfermedades relacionadas con lo inmune se pueden tratar al suprimir o potenciar la respuesta inmune. Las moléculas que potencian la respuesta inmune estimulan o potencian la respuesta inmune a un antígeno. Las moléculas que estimulan la respuesta inmune se

pueden usar terapéuticamente en donde sería benéfica la intensificación de la respuesta inmune. Alternativamente, las moléculas que suprimen la respuesta inmune, atenúan o reducen la respuesta inmune a un antígeno (*por ejemplo*, anticuerpos neutralizantes) se pueden usar terapéuticamente en donde sería benéfica la atenuación de la respuesta inmune (*por ejemplo*, inflamación). De esta manera, los polipéptidos IL-17A/F de la presente invención y agonistas y antagonistas del mismo también son útiles para preparar medicinas y medicamentos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y relacionadas con lo inmune. En un aspecto específico, tales medicinas y medicamentos comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido IL-17A/F, agonista o antagonista del mismo con un portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la mezcla es estéril.

En una realización adicional, la invención se refiere a un método de identificación de agonistas de, o antagonistas para un polipéptido IL-17A/F el cual comprende poner en contacto el polipéptido IL-17A/F con una molécula candidato y observar una actividad biológica mediada por el polipéptido IL-17A/F. Preferiblemente, el polipéptido IL-17A/F es un polipéptido de secuencia nativa IL-17A/F. En un aspecto específico, el agonista o antagonista IL-17A/F es un anticuerpo anti-IL-17A/F.

En otra realización, la invención se refiere a una composición de materia que comprende un polipéptido IL-17A/F o un anticuerpo agonista o antagonista el cual se enlaza al polipéptido en mezcla con un portador o excipiente. En un
5 aspecto, la composición comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido o anticuerpo. En otro aspecto, cuando la composición comprende una molécula estimuladora inmune, la composición es útil para: (a) mejorar la infiltración de células inflamatorias dentro de un tejido
10 de un mamífero que necesita del mismo, (b) estimular o potenciar una respuesta inmune en un mamífero que necesita del mismo, (c) incrementar la proliferación de linfocitos "T" en un mamífero que necesita del mismo en respuesta a un antígeno, (d) estimular la actividad de linfocitos "T" o (e)
15 incrementar la permeabilidad vascular. En un aspecto adicional, cuando la composición comprende una molécula inhibidora inmune, la composición es útil para: (a) disminuir la infiltración de células inflamatorias dentro de un tejido de un mamífero que necesita del mismo, (b) inhibir o reducir
20 una respuesta inmune en un mamífero que necesita del mismo, (c) disminuir la actividad de linfocitos "T" o (d) disminuir la proliferación de linfocitos "T" en un mamífero que necesita del mismo en respuesta a un antígeno. En otro aspecto, la composición comprende un ingrediente activo
25 adicional, el cual puede, por ejemplo, ser un anticuerpo

adicional o un agente citotóxico o quimioterapéutico. Preferiblemente, la composición es estéril.

En otra realización, la invención se refiere a un método de tratamiento de un trastorno relacionado con lo inmune en un mamífero que necesita del mismo, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido IL-17A/F, un agonista del mismo, o un antagonista para ello. En un aspecto preferido, el trastorno relacionado con lo inmune se selecciona del grupo que consiste de: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil crónica, espondiloartropatías, esclerosis sistémica, miopatías inflamatorias idiopáticas, síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, tiroiditis, diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por lo inmune, enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis activa crónica autoinmune, infecciosa, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y colangitis esclerotizante, enfermedad inflamatoria del intestino, enteropatía sensible al gluten, y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel mediadas por lo inmune o autoinmunes

incluyendo enfermedades de la piel bulosa, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a alimentos y urticaria, enfermedades
5 inmunológicas del pulmón tales como neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas con transplantes incluyendo rechazo de injertos y enfermedad de injerto contra huésped.

10 En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo el cual específicamente se enlaza a cualquiera de los polipéptidos antes o abajo descritos. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo humanizado, fragmento de anticuerpos o anticuerpo de cadena
15 sencilla. En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado el cual enlaza a un polipéptido IL-17A/F. En otro aspecto, el anticuerpo imita la actividad de un polipéptido IL-17A/F (un anticuerpo agonista) o inversamente el anticuerpo inhibe o neutraliza la actividad
20 de un polipéptido IL-17A/F (un anticuerpo antagonista). En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, el cual preferiblemente tiene residuos de una región determinante de la complementariedad no humana (CDR) y residuos de una región de estructura humana (FR). El
25 anticuerpo se puede etiquetar o se puede inmovilizar sobre un

soporte sólido. En un aspecto adicional, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de cadena sencilla, o un anticuerpo anti-idiotípico. En otro aspecto, el fragmento de anticuerpos o anticuerpo de cadena sencilla comprende un fragmento Fab seleccionado del grupo que consiste de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 6 como SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, y SEQ ID NO:42, en donde el fragmento Fab comprende además tres regiones variables de cadena pesada que contienen CDR-H1 que consiste de los residuos de aminoácidos 7 a 16 de SEQ ID NOs:9-42, CDR-H2 que consiste de los residuos de aminoácidos 30 a 46 de SEQ ID NOs:9-42, y CDR-H3 que consiste de los residuos de aminoácidos 78 a al menos el residuo de aminoácidos 96 de SEQ ID NOs:9-42, en donde el fragmento Fab puede enlazar a IL-17A/F. En otro aspecto, el fragmento de anticuerpos o anticuerpo de cadena sencilla comprende un fragmento Fab seleccionado del grupo que consiste de la

secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 6 como
 SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID
 NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID
 NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID
 5 NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID
 NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID
 NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID
 NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID
 NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID
 10 NO:41, y SEQ ID NO:42, en donde el fragmento Fab comprende
 además al menos la región variable de cadena pesada que
 contiene CDR-H1 que consiste de los residuos de aminoácidos 7
 al 16 de SEQ ID NOS:9-42, y CDR-H2 que consiste de los
 residuos de aminoácidos 30 al 46 de SEQ ID NOS:9-42, en donde
 15 el fragmento Fab puede enlazar a IL-17A/F. En otro aspecto,
 el fragmento de anticuerpos o anticuerpo de cadena sencilla
 comprende un fragmento Fab seleccionado del grupo que
 consiste de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la
 Figura 6 como SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:11, SEQ ID
 20 NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID
 NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID
 NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID
 NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID
 NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID
 25 NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID

NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, y SEQ ID NO:42, en donde el fragmento Fab comprende además al menos regiones variables de cadena pesada que contienen CDR-H1 que consiste de los residuos de aminoácidos 7 a 16 de SEQ ID NOs:9-42 y CDR-H3 que consiste del residuo de aminoácidos 78 a al menos el residuo de aminoácidos 96 de SEQ ID NOs:9-42, en donde el fragmento Fab puede enlazar a IL-17A/F. En otro aspecto, el fragmento de anticuerpos o anticuerpo de cadena sencilla comprende un fragmento Fab seleccionado del grupo que consiste de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 6 como SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, y SEQ ID NO:42, en donde el fragmento Fab comprende además al menos regiones variables de cadena pesada que contienen CDR-H2 que consiste de los residuos de aminoácidos 30 al 46 de SEQ ID NOs:9-42, y CDR-H3 que consiste del residuo de aminoácidos 78 a al menos el residuo de aminoácidos 96 de SEQ ID NOs:9-42, en donde el fragmento Fab

puede enlazar a IL-17A/F. En otro aspecto, el fragmento de anticuerpos o anticuerpo de cadena sencilla comprende un fragmento Fab seleccionado del grupo que consiste de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 6 como

5 SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID

10 NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, y SEQ ID NO:42, en donde el fragmento Fab comprende además al menos una de la región variable de cadena pesada

15 que contiene CDR-H1 que consiste de los residuos de aminoácidos 7 al 16 de SEQ ID NOs:9-42, CDR-H2 que consiste de los residuos de aminoácidos 30 al 46 de SEQ ID NOs:9-42, o CDR-H3 que consiste del residuo de aminoácidos 78 a al menos el residuo de aminoácidos 96 de SEQ ID NOs:9-42, en donde el

20 fragmento Fab puede enlazar a IL-17A/F. En otro aspecto, la región CDR-H1 de SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID

25 NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID

NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID
NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID
NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID
NO:40, SEQ ID NO:41, o SEQ ID NO:42 comprende al menos los
5 residuos de aminoácidos 7-10 que corresponden a la secuencia
de aminoácidos GFTI (designada en la presente como SEQ ID
NO:77), en donde la SEQ ID NO:77 puede enlazar a IL-17A/F.
En otro aspecto, la región CDR-H2 de SEQ ID NO:9, SEQ ID
NO:10; SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID
10 NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID
NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID
NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID
NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID
NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID
15 NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID
NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, o SEQ ID
NO:42 comprende al menos los residuos de aminoácidos 41-46
que corresponden a la secuencia de aminoácidos YADSVK
(designada en la presente como SEQ ID NO:78), en donde la SEQ
20 ID NO:78 puede enlazar a IL-17A/F.

Todavía en otra realización, la invención se refiere a
una molécula aislada de ácidos nucleicos seleccionada del
grupo que consiste de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID
NO:43, SEQ ID NO:44, SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:46, SEQ ID
25 NO:47, SEQ ID NO:48, SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID

NO:51, SEQ ID NO:52, SEQ ID NO:53, SEQ ID NO:54, SEQ ID
NO:55, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:57, SEQ ID NO:58, SEQ ID
NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID
NO:63, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:66, SEQ ID
5 NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID
NO:71, SEQ ID NO:72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75
y SEQ ID NO:76, en donde la molécula de ácido nucleico
codifica el fragmento Fab mostrado como SEQ ID NO:9, SEQ ID
NO:10; SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID
10 NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID
NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID
NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID
NO:26, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29, SEQ ID
NO:30, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:33, SEQ ID
15 NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37, SEQ ID
NO:38, SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, o SEQ ID
NO:42, en donde el fragmento Fab puede enlazar a IL-17A/F.

En otro aspecto, la invención proporciona un fragmento
Fab aislado capaz de enlazar IL-17A/F codificado por una
20 secuencia de nucleótidos que codifica tal secuencia de
aminoácidos como se describe anteriormente. Los procesos para
producir los mismos también se describen en la presente, en
donde esos procesos comprenden cultivar una célula hospedera
que comprende un vector el cual comprende la molécula
25 codificadora apropiada de ácido nucleico bajo condiciones

adecuadas para la expresión del fragmento Fab y recuperar el fragmento Fab del cultivo celular.

Todavía en otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-IL-17A/F en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo. Preferiblemente, la composición es estéril. La composición se puede administrar en la forma de una formulación farmacéutica líquida, la cual se puede conservar para lograr una estabilidad prolongada de almacenamiento. Alternativamente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo de cadena sencilla.

En una realización adicional, la invención se refiere a un artículo de manufactura, que comprende:

(a) una composición de materia que comprende un polipéptido IL-17A/F o agonista, antagonista, o un anticuerpo que enlaza específicamente al polipéptido del mismo;

(b) un recipiente que contiene la composición; y

(c) una etiqueta fijada al recipiente, o un inserto de empaque incluido en el recipiente que se refiere al uso del polipéptido IL-17A/F o agonista o antagonista del mismo en el tratamiento de una enfermedad relacionada con lo inmune. La composición puede comprender una cantidad terapéuticamente

efectiva del polipéptido IL-17A/F o el agonista o antagonista del mismo.

Todavía en otra realización, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico de una enfermedad relacionada con lo inmune en un mamífero, que comprende
5 detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido IL-17A/F (a) en una muestra de prueba de células de tejido obtenidas del mamífero, y (b) en una muestra de control de células de tejido normales conocidas del mismo
10 tipo de células, en donde un nivel de expresión superior o inferior en la muestra de prueba en comparación con la muestra de control indica la presencia de enfermedad relacionada con lo inmune en el mamífero a partir del cual se obtuvieron las células del tejido de prueba.

En otra realización, la presente invención se refiere a
15 un método de diagnóstico una enfermedad inmune en un mamífero, que comprende (a) poner en contacto un anticuerpo anti-IL-17A/F con una muestra de prueba de células de tejido obtenida del mamífero, y (b) detectar la formación de un
20 complejo entre el anticuerpo y un polipéptido IL-17A/F, en la muestra de prueba; en donde la formación del complejo es indicativa de la presencia o ausencia de la enfermedad. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa, y se puede efectuar en comparación al observar la formación del complejo
25 en una muestra de control de células de tejido normal

conocidas del mismo tipo celular. Una mayor cantidad de complejos formados en la muestra de prueba indica la presencia o ausencia de una enfermedad inmune en el mamífero a partir del cual se obtuvieron las células del tejido de prueba. El anticuerpo preferiblemente lleva una etiqueta detectable. La formación del complejo se puede monitorear, por ejemplo, por microscopio de luz, citometría de flujo, fluorimetría, u otras técnicas conocidas en el arte. La muestra de prueba se obtiene usualmente de un individuo que se sospecha que tiene una deficiencia o anormalidad del sistema inmune.

En otra realización, la invención proporciona un método para determinar la presencia de un polipéptido IL-17A/F en una muestra que comprende exponer una muestra de prueba de células que se sospecha que contienen el polipéptido IL-17A/F a un anticuerpo anti-IL-17A/F y determinar el enlace del anticuerpo a la muestra de células. En un aspecto específico, la muestra comprende una célula que se sospecha que contiene el polipéptido IL-17A/F y el anticuerpo se enlaza a la célula. El anticuerpo es preferiblemente etiquetado de manera detectable y/o enlazado a un soporte sólido.

En otra realización, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico para una enfermedad relacionada con lo inmune, que comprende un anticuerpo anti-IL-17A/F y un

portador en un empaque adecuado. El kit preferiblemente contiene instrucciones para usar el anticuerpo para detectar la presencia del polipéptido IL-17A/F. Preferiblemente el portador es farmacéuticamente aceptable.

5 En otra realización, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico, que contiene un anticuerpo anti-IL-17A/F en un empaque adecuado. El kit preferiblemente contiene instrucciones para usar el anticuerpo para detectar el polipéptido IL-17A/F.

10 En otra realización, la invención proporciona un método de diagnóstico de una enfermedad relacionada con lo inmune en un mamífero el cual comprende detectar la presencia o ausencia o un polipéptido IL-17A/F en una muestra de prueba de células de tejido obtenidas del mamífero, en donde la
15 presencia o ausencia del polipéptido IL-17A/F en la muestra de prueba es indicativa de la presencia de una enfermedad relacionada con lo inmune en el mamífero.

 En otra realización, la presente invención se refiere a un método para identificar un agonista de un polipéptido IL-
20 17A/F que comprende:

 (a) poner en contacto las células y un compuesto de prueba a seleccionarse bajo condiciones adecuadas para la inducción de una respuesta celular normalmente inducida por un polipéptido IL-17A/F; y (b) determinar la inducción de la
25 respuesta celular para determinar si el compuesto de prueba

es un agonista efectivo, en donde la inducción de la respuesta celular es indicativa del compuesto de prueba que es un agonista efectivo.

En otra realización, la invención se refiere a un método
5 para identificar un compuesto capaz de inhibir la actividad de un polipéptido IL-17A/F, que comprende poner en contacto un compuesto candidato con un polipéptido IL-17A/F bajo condiciones y por un tiempo suficiente para permitir a estos dos componentes interactuar y determinar si se inhibe la
10 actividad del polipéptido IL-17A/F. En un aspecto específico, ya sea el compuesto candidato o el polipéptido IL-17A/F se inmoviliza sobre un soporte sólido. En otro aspecto, el componente no inmovilizado lleva una etiqueta detectable. En un aspecto preferido, este método comprende
15 las etapas de:

(a) poner en contacto las células y un compuesto de prueba a seleccionarse en la presencia de un polipéptido IL-17A/F bajo condiciones adecuadas para la inducción de una respuesta celular normalmente inducida por un polipéptido IL-
20 17A/F; y (b) determinar la inducción de la respuesta celular para determinar si el compuesto de prueba es un antagonista efectivo.

En otra realización, la invención proporciona un método para identificar un compuesto que inhibe la expresión de un
25 polipéptido IL-17A/F en células que normalmente expresan el

polipéptido, en donde el método comprende poner en contacto las células con un compuesto de prueba y determinar si se inhibe la expresión del polipéptido IL-17A/F. En un aspecto preferido, este método comprende las etapas de:

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

Todavía en otra realización, la presente invención se
10 refiere a un método para tratar un trastorno relacionado con lo inmune en un mamífero que padece de ello, que comprende administrar al mamífero una molécula de ácido nucleico que codifica ya sea (a) un polipéptido IL-17A/F, (b) un agonista de un polipéptido IL-17A/F o (c) un antagonista de un
15 polipéptido IL-17A/F, en donde el agonista o antagonista puede ser un anticuerpo anti-IL-17A/F. En una realización preferida, el mamífero es humano. En otra realización preferida, el ácido nucleico se administra por medio de terapia génica *ex vivo*. En una realización adicional
20 preferida, el ácido nucleico está comprendido dentro de un vector, más preferiblemente un vector adenoviral, viral asociado con adeno, lentiviral o vector retroviral.

Todavía en otro aspecto, la invención proporciona una partícula viral recombinante que comprende un vector viral
25 que consiste esencialmente de un promotor, ácido nucleico que

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

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

20 Todavía en una realización adicional, la invención proporciona un método para potenciar la infiltración de células inflamatorias desde la vascularidad dentro de un tejido de un mamífero que comprende administrar al mamífero (a) un polipéptido IL-17A/F o (b) un agonista de un

polipéptido IL-17A/F, en donde se potencia la infiltración de células inflamatorias desde la vascularidad en el mamífero.

Todavía en una realización adicional, la invención proporciona un método para disminuir la infiltración de
5 células inflamatorias de la vascularidad dentro de un tejido de un mamífero que comprende administrar al mamífero (a) un polipéptido IL-17A/F o (b) un antagonista de un polipéptido IL-17A/F, en donde se disminuye la infiltración de células inflamatorias de la vascularidad en el mamífero.

10 Todavía en una realización adicional, la invención proporciona un método para incrementar la actividad de linfocitos "T" en un mamífero que comprende administrar al mamífero (a) un polipéptido IL-17A/F o (b) un agonista de un polipéptido IL-17A/F, en donde se incrementa la actividad de
15 linfocitos "T" en el mamífero.

Todavía en una realización adicional, la invención proporciona un método para disminuir la actividad de linfocitos "T" en un mamífero que comprende administrar al mamífero (a) un polipéptido IL-17A/F o (b) un antagonista de
20 un polipéptido IL-17A/F, en donde se disminuye la actividad de linfocitos "T" en el mamífero.

Todavía en una realización adicional, la invención proporciona un método para incrementar la proliferación de linfocitos "T" en un mamífero que comprende administrar al
25 mamífero (a) un polipéptido IL-17A/F o (b) un agonista de un

polipéptido IL-17A/F, en donde se incrementa la proliferación de linfocitos "T" en el mamífero.

Todavía en una realización adicional, la invención proporciona un método para disminuir la proliferación de
5 linfocitos "T" en un mamífero que comprende administrar al mamífero (a) un polipéptido IL-17A/F o (b) un antagonista de un polipéptido IL-17A/F, en donde se disminuye la proliferación de linfocitos "T" en el mamífero.

Aún en una realización adicional, la invención se
10 refiere al uso de un polipéptido IL-17A/F, o un agonista o antagonista del mismo como se ha descrito hasta aquí, o un anticuerpo anti-IL-17A/F, para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una condición la cual tiene respuesta al polipéptido IL-17A/F o un agonista o
15 antagonista del mismo (*por ejemplo*, anti-IL-17A/F). En un aspecto particular, la invención se refiere al uso de un polipéptido IL-17A/F, o un agonista o antagonista del mismo en un método para tratar un trastorno degenerativo de los cartílagos.

20 Aún en una realización adicional, la invención se refiere a un método de tratamiento de un trastorno degenerativo de los cartílagos en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido IL-17A/F, agonista, o antagonista del mismo al
25 mamífero que padece del trastorno.

Aún en una realización adicional, la invención se refiere a un kit que comprende una composición que comprende un polipéptido IL-17A/F, o un agonista o antagonista del mismo, en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable; un recipiente que contiene la composición, y una etiqueta
5 fija al recipiente, que se refiere al uso de la composición, en el tratamiento de un trastorno degenerativo de los cartílagos.

En otra realización, la invención se refiere a un método
10 de tratamiento de un trastorno relacionado con lo inmune en un mamífero que necesita del mismo que comprende la dirección simultánea de IL-17A y IL-17F en el mamífero en donde el método comprende la administración simultánea al mamífero de una cantidad terapéuticamente efectiva de dos anticuerpos
15 diferentes, en donde un anticuerpo específicamente se enlaza a IL-17A y el otro anticuerpo específicamente se enlaza a IL-17F. El trastorno relacionado con lo inmune puede ser lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil crónica, una espondiloartropatía, esclerosis
20 sistémica, una miopatía inflamatoria idiopática, síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, tiroiditis, diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por lo inmune, una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central o
25 periférico, polineuropatía desmielinizante idiopática,

síndrome de Guillain-Barré, una polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, una enfermedad hepatobiliar, hepatitis activa crónica autoinmune o infecciosa, cirrosis biliar primaria, hepatitis
5 granulomatosa, colangitis esclerotizante, enfermedad inflamatoria del intestino, enteropatía sensible al gluten, enfermedad de Whipple, una enfermedad de la piel mediada por lo inmune o autoinmune, una enfermedad bulosa de la piel, eritema multiforme, dermatitis de contacto, psoriasis, una
10 enfermedad alérgica, asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a alimentos, urticaria, una enfermedad inmunológica del pulmón, neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática, neumonitis por hipersensibilidad, una enfermedad asociada con transplantes,
15 rechazo de injertos o enfermedad de injerto contra huésped.

En otra realización, la invención se refiere a un método de tratamiento de un trastorno relacionado con lo inmune en un mamífero que necesita del mismo que comprende la dirección simultánea de IL-17A y IL-17F en el mamífero en donde el
20 método comprende la administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de reacción cruzada en donde el anticuerpo reconoce epítomos idénticos o similares presentes en ambos IL-17A, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
25 NO: 3, y IL-17F, un polipéptido que tiene la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 4. El trastorno relacionado con lo
inmune puede ser lupus eritematoso sistémico, artritis
reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil crónica, una
espondiloartropatía, esclerosis sistémica, una miopatía
5 inflamatoria idiopática, síndrome de Sjögren, vasculitis
sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune,
trombocitopenia autoinmune, tiroiditis, diabetes mellitus,
enfermedad renal mediada por lo inmune, una enfermedad
desmielinizante del sistema nervioso central o periférico,
10 polineuropatía desmielinizante idiopática, síndrome de
Guillain-Barré, una polineuropatía desmielinizante
inflamatoria crónica, una enfermedad hepatobiliar, hepatitis
activa crónica autoinmune o infecciosa, cirrosis biliar
primaria, hepatitis granulomatosa, colangitis esclerotizante,
15 enfermedad inflamatoria del intestino, enteropatía sensible
al gluten, enfermedad de Whipple, una enfermedad de la piel
mediada por lo inmune o autoinmune, una enfermedad bulosa de
la piel, eritema multiforme, dermatitis de contacto,
psoriasis, una enfermedad alérgica, asma, rinitis alérgica,
20 dermatitis atópica, hipersensibilidad a alimentos, urticaria,
una enfermedad inmunológica del pulmón, neumonía
eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática, neumonitis por
hipersensibilidad, una enfermedad asociada con transplantes,
rechazo de injertos o enfermedad de injerto contra huésped.

En otra realización, la invención se refiere a un método de tratamiento de un trastorno relacionado con lo inmune en un mamífero que necesita del mismo que comprende la dirección simultánea de IL-17A y IL-17F en el mamífero en donde el
5 método comprende la administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo biespecífico en donde el anticuerpo consiste de dos extremos o brazos en donde un brazo del anticuerpo reconoce IL-17A y el otro brazo del anticuerpo reconoce IL-17F. El trastorno
10 relacionado con lo inmune puede incluir lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil crónica, una espondiloartropatía, esclerosis sistémica, una miopatía inflamatoria idiopática, síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica
15 autoinmune, trombocitopenia autoinmune, tiroiditis, diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por lo inmune, una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central o periférico, polineuropatía desmielinizante idiopática, síndrome de Guillain-Barré, una polineuropatía
20 desmielinizante inflamatoria crónica, una enfermedad hepatobiliar, hepatitis activa crónica autoinmune o infecciosa, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, colangitis esclerotizante, enfermedad inflamatoria del intestino, enteropatía sensible al gluten,
25 enfermedad de Whipple, una enfermedad de la piel mediada por

lo inmune o autoinmune, una enfermedad bulosa de la piel, eritema multiforme, dermatitis de contacto, psoriasis, una enfermedad alérgica, asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a alimentos, urticaria, una
5 enfermedad inmunológica del pulmón, neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática, neumonitis por hipersensibilidad, una enfermedad asociada con transplantes, rechazo de injertos o enfermedad de injerto contra huésped.

En otra realización, la invención se refiere a un método
10 de tratamiento de un trastorno relacionado con lo inmune en un mamífero que necesita del mismo, que comprende la dirección simultánea de IL-17A y IL-17F en el mamífero en donde el método comprende la administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo
15 biespecífico en donde el anticuerpo consiste de una cadena pesada la cual reconoce IL-17A y una cadena ligera la cual reconoce IL-17F. El trastorno relacionado con lo inmune puede incluir lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil crónica, una
20 espondiloartropatía, esclerosis sistémica, una miopatía inflamatoria idiopática, síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, tiroiditis, diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por lo inmune, una enfermedad
25 desmielinizante del sistema nervioso central o periférico,

polineuropatía desmielinizante idiopática, síndrome de
Guillain-Barré, una polineuropatía desmielinizante
inflamatoria crónica, una enfermedad hepatobiliar, hepatitis
activa crónica autoinmune o infecciosa, cirrosis biliar
5 primaria, hepatitis granulomatosa, colangitis esclerotizante,
enfermedad inflamatoria del intestino, enteropatía sensible
al gluten, enfermedad de Whipple, una enfermedad de la piel
mediada por lo inmune o autoinmune, una enfermedad bulosa de
la piel, eritema multiforme, dermatitis de contacto,
10 psoriasis, una enfermedad alérgica, asma, rinitis alérgica,
dermatitis atópica, hipersensibilidad a alimentos, urticaria,
una enfermedad inmunológica del pulmón, neumonía
eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática, neumonitis por
hipersensibilidad, una enfermedad asociada con transplantes,
15 rechazo de injertos o enfermedad de injerto contra huésped.

En otra realización, la invención se refiere a un método
de tratamiento de un trastorno relacionado con lo inmune en
un mamífero que necesita del mismo que comprende la dirección
simultánea de IL-17A y IL-17F en el mamífero en donde el
20 método comprende la administración al mamífero de una
cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo
bienespecífico en donde el anticuerpo consiste de una cadena
pesada la cual reconoce a IL-17F y una cadena ligera la cual
reconoce a IL-17A. El trastorno relacionado con lo inmune
25 puede incluir lupus eritematoso sistémico, artritis

reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil crónica, una
espondiloartropatía, esclerosis sistémica, una miopatía
inflamatoria idiopática, síndrome de Sjögren, vasculitis
sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune,
5 trombocitopenia autoinmune, tiroiditis, diabetes mellitus,
enfermedad renal mediada por lo inmune, una enfermedad
desmielinizante del sistema nervioso central o periférico,
polineuropatía desmielinizante idiopática, síndrome de
Guillain-Barré, una polineuropatía desmielinizante
10 inflamatoria crónica, una enfermedad hepatobiliar, hepatitis
activa crónica autoinmune o infecciosa, cirrosis biliar
primaria, hepatitis granulomatosa, colangitis esclerotizante,
enfermedad inflamatoria del intestino, enteropatía sensible
al gluten, enfermedad de Whipple, una enfermedad de la piel
15 mediada por lo inmune o autoinmune, una enfermedad bulosa de
la piel, eritema multiforme, dermatitis de contacto,
psoriasis, una enfermedad alérgica, asma, rinitis alérgica,
dermatitis atópica, hipersensibilidad a alimentos, urticaria,
una enfermedad inmunológica del pulmón, neumonía
20 eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática, neumonitis por
hipersensibilidad, una enfermedad asociada con transplantes,
rechazo de injertos o enfermedad de injerto contra huésped.

B. Realizaciones Adicionales

En otras realizaciones de la presente invención, la invención proporciona una molécula aislada de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que
5 codifica un polipéptido IL-17A/F.

En un aspecto, la molécula aislada de ácidos nucleicos comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 81% de identidad de
10 secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 82% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 83% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos
alrededor de 84% de identidad de secuencia de ácido nucleico,
15 alternativamente al menos alrededor de 85% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 86% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 87% de identidad de
secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos
20 alrededor de 88% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 89% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia de ácido nucleico,
alternativamente al menos alrededor de 91% de identidad de
25 secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos

alrededor de 92% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 93% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 94% de identidad de secuencia de ácido nucleico, 5 alternativamente al menos alrededor de 95% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 96% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 97% de identidad de secuencia de ácido nucleico, 10 alternativamente al menos alrededor de 98% de identidad de secuencia de ácido nucleico y alternativamente al menos alrededor de 99% de identidad de secuencia de ácido nucleico para (a) una molécula de ADN que codifica un polipéptido IL-17A/F que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa como se describe en la 15 presente, una secuencia de aminoácidos que carece del péptido de señal como se describe en la presente, o cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos de longitud completa como se describe en la presente, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

20 En otros aspectos, la molécula aislada de ácidos nucleicos comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 81% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al 25 menos alrededor de 82% de identidad de secuencia de ácido

nucleico, alternativamente al menos alrededor de 83% de
identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al
menos alrededor de 84% de identidad de secuencia de ácido
nucleico, alternativamente al menos alrededor de 85% de
5 identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al
menos alrededor de 86% de identidad de secuencia de ácido
nucleico, alternativamente al menos alrededor de 87% de
identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al
menos alrededor de 88% de identidad de secuencia de ácido
10 nucleico, alternativamente al menos alrededor de 89% de
identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al
menos alrededor de 90% de identidad de secuencia de ácido
nucleico, alternativamente al menos alrededor de 91% de
identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al
15 menos alrededor de 92% de identidad de secuencia de ácido
nucleico, alternativamente al menos alrededor de 93% de
identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al
menos alrededor de 94% de identidad de secuencia de ácido
nucleico, alternativamente al menos alrededor de 95% de
20 identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al
menos alrededor de 96% de identidad de secuencia de ácido
nucleico, alternativamente al menos alrededor de 97% de
identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al
menos alrededor de 98% de identidad de secuencia de ácido
25 nucleico y alternativamente al menos alrededor de 99% de

identidad de secuencia de ácido nucleico para (a) una molécula de ADN que comprende la secuencia codificadora de un ADNc del polipéptido IL-17A/F de longitud completa como se describe en la presente, la secuencia codificadora de un polipéptido IL-17A/F que carece del péptido de señal como se describe en la presente, o la secuencia codificadora de cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos de longitud completa como se describe en la presente, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

En un aspecto adicional, la invención se refiere a una molécula aislada de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 81% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 82% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 83% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 84% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 85% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 86% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 87% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 88% de

identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 89% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 91% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 92% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 93% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 94% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 95% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 96% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 97% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos alrededor de 98% de identidad de secuencia de ácido nucleico y alternativamente al menos alrededor de 99% de identidad de secuencia de ácido nucleico para (a) una molécula de ADN que codifica el mismo polipéptido maduro codificado por cualquiera de los ADNc de proteína humana depositado con la ATCC como se describe en la presente, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

Otra realización se dirige a fragmentos de una secuencia codificadora de polipéptido IL-17A/F, o el complemento del mismo, que puede encontrar uso como, por ejemplo, sondas de hibridación, que codifica fragmentos de un polipéptido IL-

17A/F que puede opcionalmente codificar un polipéptido que comprende un sitio de enlace para un anticuerpo anti-IL-17A/F o como sondas antisentido de oligonucleótidos. Tales fragmentos de ácidos nucleicos tienen usualmente al menos
5 alrededor de 20 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 30 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 40 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 50 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor
10 de 60 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 70 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 80 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 90 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 100
15 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 110 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 120 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 130 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 140 nucleótidos de
20 longitud, alternativamente al menos alrededor de 150 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 160 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 170 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 180 nucleótidos de longitud,
25 alternativamente al menos alrededor de 190 nucleótidos de

longitud, alternativamente al menos alrededor de 200 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 250 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 300 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 350 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 400 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 450 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 500 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 600 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 700 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 800 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 900 nucleótidos de longitud y alternativamente al menos alrededor de 1000 nucleótidos de longitud, en donde en este contexto el término "alrededor de" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos de referencia más o menos 10% de esa longitud de referencia. Se observa que los fragmentos novedosos de una secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido IL-17A/F se puede determinar de una forma de rutina al alinear la secuencia de nucleótidos que codifica al polipéptido IL-17A/F con otras secuencias de nucleótidos conocidas al usar cualquiera de varios programas de alineación de secuencias bien conocidos y determinar cuales fragmento(s) de secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido son novedosos.

Todas esas secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos se contemplan en la presente. También se contemplan fragmentos de polipéptidos codificados por estos fragmentos de moléculas de nucleótido, preferiblemente aquellos fragmentos de polipéptido IL-17A/F que comprenden un sitio de enlace para un anticuerpo anti-IL-17A/F.

En otra realización, la invención proporciona un polipéptido aislado IL-17A/F codificado por las secuencias aisladas de ácidos nucleicos identificadas anteriormente.

En un determinado aspecto, la invención se refiere a un polipéptido aislado IL-17A/F, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 81% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 82% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 83% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 84% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 85% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 86% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 87% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 88% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor

de 89% de identidad de secuencia de aminoácidos,
alternativamente al menos alrededor de 90% de identidad de
secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor
de 91% de identidad de secuencia de aminoácidos,
5 alternativamente al menos alrededor de 92% de identidad de
secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor
de 93% de identidad de secuencia de aminoácidos,
alternativamente al menos alrededor de 94% de identidad de
secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor
10 de 95% de identidad de secuencia de aminoácidos,
alternativamente al menos alrededor de 96% de identidad de
secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor
de 97% de identidad de secuencia de aminoácidos,
alternativamente al menos alrededor de 98% de identidad de
15 secuencia de aminoácidos y alternativamente al menos
alrededor de 99% de identidad de secuencia de aminoácidos a
un polipéptido IL-17A/F que tiene una secuencia de
aminoácidos de longitud completa como se describe en la
presente, una secuencia de aminoácidos que carece del péptido
20 de señal como se describe en la presente, como se describe en
la presente o cualquier otro fragmento específicamente
definido de la secuencia de aminoácidos de longitud completa
como se describe en la presente.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un
25 polipéptido aislado IL-17A/F que comprende una secuencia de

aminoácidos que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 81% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 82% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 83% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 84% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 85% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 86% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 87% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 88% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 89% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 91% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 92% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 93% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 94% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 95% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 96% de identidad de

secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 97% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 98% de identidad de secuencia de aminoácidos y alternativamente al menos
5 alrededor de 99% de identidad de secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por alguno de los ADNc de proteína humana depositados con la ATCC como se describe en la presente.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un
10 polipéptido aislado IL-17A/F que comprende una secuencia de aminoácidos que califica al menos alrededor de 80% positivos, alternativamente al menos alrededor de 81% positivos, alternativamente al menos alrededor de 82% positivos, alternativamente al menos alrededor de 83% positivos,
15 alternativamente al menos alrededor de 84% positivos, alternativamente al menos alrededor de 85% positivos, alternativamente al menos alrededor de 86% positivos, alternativamente al menos alrededor de 87% positivos, alternativamente al menos alrededor de 88% positivos,
20 alternativamente al menos alrededor de 89% positivos, alternativamente al menos alrededor de 90% positivos, alternativamente al menos alrededor de 91% positivos, alternativamente al menos alrededor de 92% positivos, alternativamente al menos alrededor de 93% positivos,
25 alternativamente al menos alrededor de 94% positivos,

alternativamente al menos alrededor de 95% positivos,
alternativamente al menos alrededor de 96% positivos,
alternativamente al menos alrededor de 97% positivos,
alternativamente al menos alrededor de 98% positivos y
5 alternativamente al menos alrededor de 99% positivos cuando
se compara con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido
IL-17A/F que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud
completa como se describe en la presente, una secuencia de
aminoácidos que carece del péptido de señal como se describe
10 en la presente, o cualquier otro fragmento específicamente
definido de la secuencia de aminoácidos de longitud completa
como se describe en la presente.

En un aspecto específico, la invención proporciona un
polipéptido aislado IL-17A/F sin la secuencia de señal en el
15 N Terminal y/o la metionina de inicio y se codifica por una
secuencia de nucleótidos que codifica tal secuencia de
aminoácidos como se ha descrito hasta aquí. Los procesos para
la producción de los mismos también se describen en la
presente, en donde esos procesos comprenden cultivar una
20 célula hospedera que comprende un vector el cual comprende la
codificación apropiada de la molécula de ácido nucleico bajo
condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido IL-
17A/F y recuperar el polipéptido IL-17A/F del cultivo
celular.

Todavía en otra realización, la invención se refiere a agonistas y antagonistas de un polipéptido nativo IL-17A/F como se define en la presente. En una realización en particular, el agonista o antagonista es un anticuerpo anti-IL-17A/F o una molécula pequeña.

En una realización adicional, la invención se refiere a un método de identificación de agonistas o antagonistas para un polipéptido IL-17A/F el cual comprende poner en contacto el polipéptido IL-17A/F con una molécula candidato y observar una actividad biológica mediada por el polipéptido IL-17A/F. Preferiblemente, el polipéptido IL-17A/F es un polipéptido nativo IL-17A/F.

Todavía en una realización adicional, la invención se refiere a una composición de materia que comprende un polipéptido IL-17A/F, o un agonista o antagonista de un polipéptido IL-17A/F como se describe en la presente, o un anticuerpo anti-IL-17A/F, en combinación con un portador. Opcionalmente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable.

Otra realización de la presente invención se dirige al uso de un polipéptido IL-17A/F, o un agonista o antagonista del mismo como se ha descrito hasta aquí, o un anticuerpo anti-IL-17A/F, para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una condición la cual responde al

polipéptido IL-17A/F, un agonista o antagonista del mismo o un anticuerpo anti-IL-17A/F.

En realizaciones adicionales de la presente invención, la invención proporciona vectores que comprenden ADN que
5 codifica cualquiera de los polipéptidos aquí descritos. La célula hospedera que comprende cualquiera de tal vector también se proporciona. A manera de ejemplo, las células hospederas pueden ser células CHO, *E. coli*, levadura o células de insectos infectadas por Baculovirus. Un proceso de
10 producción de cualquiera de los polipéptidos aquí descritos se proporciona además y comprende cultivar células hospederas bajo condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

15 En otras realizaciones, la invención proporciona moléculas quiméricas que comprenden cualquiera de los polipéptidos aquí descritos fusionados a un polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos. Ejemplo de tales moléculas quiméricas comprenden cualquiera de los
20 polipéptidos aquí descritos fusionados a una secuencia de etiqueta de epítipo o una región Fc de una inmunoglobulina.

Todavía en otra realización, la invención proporciona un anticuerpo el cual específicamente se enlaza a cualquiera de los polipéptidos arriba o abajo descritos. Opcionalmente, el
25 anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo

humanizado, fragmento de anticuerpos o anticuerpo de cadena sencilla.

Todavía en otras realizaciones, la invención proporciona sondas de oligonucleótido útiles para aislar secuencias de nucleótidos de ADNc y genómicas o como sondas antisentido, en donde esas sondas se pueden derivar de cualquiera de las secuencias de nucleótidos arriba o abajo descritas.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

10

La Figura 1 muestra los resultados de expresar y aislar una citoquina humana novedosa designada como IL-17A/F. Las células de riñón 293 humanas se transfectaron con vectores de expresión de ADNc que codifican IL-17 y IL-17F humanos solos o en combinación como se indica en la Figura 1A y Figura 1B. Los medios acondicionados de las células transfectadas se inmunoprecipitaron (IP) utilizando anticuerpos que pueden reconocer IL-17 (pistas 1-5), o IL-17F (pistas 6-10) como se indica en la Figura 1A y Figura 1B. El análisis por tinción Western se muestra al demostrar la presencia de un complejo dimérico IL-17A/F en la pista 8 de la Figura 1A y en la pista 3 de la Figura 1B. El complejo dimérico IL-17A/F es consistente en tamaño con una especie heterodimérica covalente que comprende una cadena de polipéptido de IL-17 y una cadena de polipéptido de IL-17F.

La Figura 2 muestra la purificación de IL-17A/F recombinante. La Figura 2A muestra los resultados de SDS-PAGE teñido con plata de las fracciones de proteínas del fraccionamiento inicial de IL-17A/F sobre una columna de S-
5 Sefarosa. Las fracciones 31 y 32 contienen una proteína con una masa molecular aparente de aproximadamente 33 kD consistente con IL-17A/F. La Figura 2B muestra los resultados de la purificación adicional de IL-17A/F al usar cromatografía en columna Vydac C4. Se muestra el cromatograma
10 de las proteínas eluidas medido a 214 nm y 280 nm. La Figura 2C demuestra que las fracciones de proteínas IL-17A/F purificadas de la columna de purificación Vydac C4 induce la producción de IL-8 en células TK-10.

La Figura 3 muestra los resultados del análisis de
15 secuencia de aminoácidos de IL-17A/F. La Figura 3A muestra el análisis no reductor de SDS-PAGE de IL-17A/F purificado. La proteína resuelta se transfirió a una membrana de PVDF y se tiñó con tinción de proteína azul de Coomassie. Las posiciones de los marcadores de peso molecular se indican del
20 lado derecho. La Figura 3B muestra los resultados del análisis de secuencias en el N terminal de IL-17A/F aislado (residuos de aminoácidos detectados de un análisis de secuencias en el terminal N de la banda que se muestra en la Figura 3A). El análisis de secuencias revela dos secuencias
25 en el N terminal (la secuencia 1 se designa SEQ ID NO:1 y la

secuencia 2 se designa SEQ ID NO:2, respectivamente). La Figura 3C muestra la secuencia de aminoácidos de IL-17 humano (mostrado tanto en la Figura 3C y Figura 8, designada SEQ ID NO:3) y la secuencia de aminoácidos de IL-17F humano (mostrados ambos en la Figura 3C y Figura 10, designada SEQ ID NO:4). Las secuencias de señal de IL-17 y IL-17F están subrayadas. Las secuencias que tienen identidad con las dos secuencias de péptidos en el N terminal (SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2) presentes en IL-17A/F se resaltan en negritas para las secuencias de polipéptidos IL-17 y IL-17F mostradas.

La Figura 4 muestra el análisis por espectrometría de masas de IL-17A/F. La Figura 4A es un esquema que muestra la secuencia de aminoácidos con sus enlaces de bisulfuro intercadena e intracadena del heterodímero maduro IL-17A/F (SEQ ID NO:77). Las cisteínas involucradas en las ligaduras de bisulfuro se indican por un punto, (•), y el número de residuo. Los enlaces de bisulfuro se indican por líneas negras que conectan las cisteínas enlazadas. Esos enlaces de bisulfuro que forman ligadura de bisulfuro entre cadenas se resaltan por las líneas negras en negritas. La Figura 4B muestra el esquema de los fragmentos de péptidos de IL-17A/F #1 y #2 que contienen enlaces de bisulfuro entre la cadena IL-17 y la cadena IL-17F que se anticiparía producir por digestión de IL-17A/F con tripsina [el fragmento de enlace bisulfuro de IL-17A/F #1 se designa SEQ ID NO:7; el fragmento

de enlace bisulfuro de IL-17A/F #2 se designa SEQ ID NO:8, respectivamente]. Los aminoácidos contenidos dentro de estos fragmentos se indican y enumeran con relación a la metionina de inicio de cada cadena. También se indica la masa molecular calculada aproximada de estos fragmentos que se
5 esperaría observar por espectrometría de masas. La Figura 4C muestra el tiempo de ionización/desorción por láser asistido con matriz del mapa de péptidos (MALDI-TOF) por espectrometría de masas de vuelo de IL-17A/F. El mapa de
10 péptidos resultante contiene picos con $[M+H]^+ = 2420.12$ Da y 3410.60 Da, consistente con los péptidos ligados al bisulfuro. La Figura 4D demuestra una caracterización adicional de muestras no reducidas de IL-17A/F por una espectrometría de masa de trampa de iones con ionización con
15 electrorroscío y cromatografía líquida (LC-ESI-MS). Los cromatogramas de iones representan (desde arriba hacia abajo) el cromatograma de iones total, cromatograma de iones reconstruido (RIC) del fragmento de enlace de bisulfuro de IL-17A/F #2 $[M+2H]^{2+}$, y el fragmento de enlace de bisulfuro
20 de IL-17A/F #1 $[M+2H]^{3+}$. Los picos consistentes con ambos heterodímeros se observaron considerando que no se observaron picos arriba del ruido químico de fondo en las masas anticipadas de los péptidos homodiméricos.

La Figura 5A muestra las curvas de respuesta a la dosis
25 que comparan la respuesta proinflamatoria inducida por IL-

17A/F, IL-17 y IL-17F. IL-17A/F, IL-17 y IL-17F se incubaron con células TK-10 a las concentraciones indicadas por 24 horas. IL-17A/F se mostró que tenía una actividad de inducción potente de IL-8 con actividad sustancial observada a concentraciones sub-nM. La Figura 5B muestra las curvas de respuesta de dosis que comparan la inducción de IL-6 por IL-17A/F, IL-17 y IL-17F. IL-17A/F, IL-17 y IL-17F se incubaron con células TK-10 a las concentraciones indicadas por 24 horas. Los medios acondicionados con TK-10 se recolectaron y analizaron por IL-6 ELISA.

La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de la región de la región variable de cadena pesada que contiene CDR H1-H3 de Fab que enlaza a IL-17A/F. Se muestra una alineación de una región de la secuencia de aminoácidos predicha de treinta y cuatro (34) clones (SEQ ID NO:9 a SEQ ID NO:42, respectivamente) que codifican diferentes secuencias de cadena pesada de anticuerpos que pueden enlazarse a IL-17A/F. Las tres regiones de cadena pesada CDR (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) se sombrean.

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

La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:3) derivada de la secuencia codificadora de SEQ ID NO:5 que se muestra en la Figura 7.

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

La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:4) derivada de la secuencia codificadora de SEQ ID NO:6
5 que se muestra en la Figura 9.

La Figura 11 muestra mediciones de IL-17A/F por ELISA de IL-17A/F producidas a partir de células T humanas activadas con anti-CD3/anti-CD28.

La Figura 12 muestra la especificidad del ELISA de IL-
10 17A/F en donde tres fracciones #31-#33 ensayadas en paralelo se mostraron para contener cantidades casi equivalentes de IL-17A/F (IL-17A y IL-17F se usaron como controles).

La Figura 13 muestra el nivel incrementado de producción de ambos IL-17A y IL-17F cuando las células T se inducen con
15 IL-6 y TGF β .

La Figura 14 detalla la familia IL-17 de citoquinas y el patrón complejo de las especificidades de traslape del receptor-ligando. De derecha a izquierda, la Figura 14 demuestra que el ligando IL-17 se enlaza al receptor IL-17
20 (IL-17R; designado en la presente PRO1); ligando IL-17B (PRO1031) se enlaza al receptor IL-17RH1 (PRO5801); el ligando IL-17E (PRO10272) se enlaza al receptor IL-17RH1 (PRO5801); el ligando IL-17F (PRO20110) se enlaza a ambos el receptor IL-17 (IL-17R, designado en la presente PRO1) así
25 como al receptor IL-17RH2 (PRO20040); ligando IL-17C

(PRO1122) y ligando IL-17D (PRO21175) no interactúan con los receptores IL-17R, IL-17RH1 o IL-17RH2.

La Figura 15 muestra la estructura de IL-17F. La Figura 15A muestra una traza de cinta del monómero IL-17F. Las hebras se etiquetan. Los bisulfuros se muestran como una representación de bola y barra con los átomos de azufre coloreados en amarillo. Las posiciones aproximadas de las cisteínas adicionales se muestran como bolas anaranjadas. El inserto muestra una representación animada del nudo canónico.

La Figura 15B muestra la traza de cinta del dímero IL-17F en rojo y azul. Los bisulfuros se muestran como en la Figura 15A. La Figura 15C muestra la estructura de NGF del complejo NGF-TrkA (Weismann *et al.*, Nature 401:184-188 (1999)). Un rizo desordenado conecta las hebras 2 y 3.

La Figura 16 muestra la alineación de secuencias de IL-17F con otros miembros de la familia IL-17. Las regiones de identidad y secuencias conservadas entre IL-17 y IL-17F están resaltadas en verde y amarillo, respectivamente. Cuando los otros miembros de la familia también tienen residuos idénticos o conservados en estas regiones, se colorean similarmente. Los residuos de cisteína se indican en anaranjado. Las serinas conservadas que reemplazan las cisteínas canónicas de nudo se resaltan con letras blancas. Los enlaces de bisulfuro los cuales se espera que se conserven en todos los IL-17s se indican por una línea negra

que conecta las cistinas enlazadas. Las dos cistinas las
cuales forman el bisulfuro entre-cadena en IL-17F se marcan
con un asterisco. Los elementos estructurales secundarios en
IL-17F se muestran arriba de las secuencias como flechas
5 azules (hebras β) o cilindros (hélice α). La numeración de
los residuos es desde el inicio de las secuencias maduras.

Las Figuras 17 muestran una comparación de la estructura
molecular de IL-17F (PRO20110) e IL-17. Dos vistas
ortogonales, "lado" (A) y "frente" (B) de la superficie
10 molecular de IL-17F coloreadas de acuerdo con la conservación
de la secuencia entre IL-17 y IL-17F como la que se muestra
en la Figura 16. La superficie e los residuos que son
idénticos entre las dos proteínas se colorean en verde, los
residuos homólogos se colorean en amarillo, mientras que los
15 residuos que difieren significativamente se colorean en
blanco. La vista en (B) se orienta aproximadamente 15° girada
desde la vista en la Figura 15B). Se etiquetan los residuos
que forman la cavidad. La Figura 17C es una vista en "corte"
de la superficie en la Figura 17B que muestra cómo las
20 cavidades grandes a cada lado de IL-17F penetran
profundamente en el cuerpo del dímero.

Las Figuras 18 muestran una comparación de la superficie
de IL-17F y el sitio de enlace TrkA sobre NGF. Las Figuras
18A y 18B muestran que la estructura molecular de IL-17F se
25 orienta como en la Figura 17. IL-17F se colorea de acuerdo

con el potencial de superficie electrostática: rojo, -5 kT, blanco, 0 kT; y azul, +5 kT. Las posiciones de las cavidades se indican por los círculos. La Figura 18C muestra la estructura molecular de NGF en la misma orientación como IL-17F en panel (B); dominio 5 de TrkA se muestra como una cinta verde (Weismann *et al.*, Nature 401:184-188 (1999); código pdb 1WWW).

Las figuras 19 y 20 muestran la eficacia de los anticuerpos anti-IL-17A/F en un modelo de ratón que tiene Artritis inducida por colágeno (CIA).

DESCRIPCION DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

I. Definiciones

Un "polipéptido de secuencia nativa IL-17A/F" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos como el correspondiente polipéptido IL-17A/F derivado de la naturaleza. Tal polipéptido de secuencia nativa IL-17A/Fs se puede aislar de la naturaleza o se puede producir por medios recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido de secuencia nativa IL-17A/F" abarca específicamente formas secretadas o truncadas que se presentan naturalmente del polipéptido específico IL-17A/F (*por ejemplo*, una secuencia de un dominio extracelular), formas variantes que se presentan naturalmente (*por ejemplo*, formas alternativamente

empalmadas) y variantes alélicas que se presentan naturalmente del polipéptido. En diversas realizaciones de la invención, los polipéptidos de secuencia nativa IL-17A/F descritos en la presente son polipéptidos de secuencias
5 nativas de longitud completa o maduras que comprenden las secuencias de aminoácidos de longitud completa mostradas en las Figuras anexas. Los codones de inicio y de detención se muestran en negritas y subrayados en las Figuras. Sin embargo, aunque los polipéptidos IL-17A/F descritos en las
10 Figuras anexas se muestran para comenzar con residuos de metionina designada en la presente como posición de aminoácidos 1 en las Figuras, es concebible y posible que otros residuos de metionina localizados ya sea cadena arriba o cadena debajo de la posición de aminoácidos 1 en las
15 Figuras se puedan emplear como el residuo de aminoácidos de partida para los polipéptidos IL-17A/F.

La ubicación aproximada de los "péptidos de señal" de los diversos polipéptidos IL-17A/F descritos en la presente se muestra en la presente especificación y/o las Figuras
20 anexas. Se observa, sin embargo, que puede variar la frontera en el C terminal de un péptido de señal, pero lo más probable por no más de alrededor de 5 aminoácidos a cada lado de la frontera en el C terminal del péptido de señal como se identifica inicialmente en la presente, en donde la frontera
25 en el C terminal del péptido de señal se puede identificar

siguiendo los criterios empleados rutinariamente en el arte para identificar el tipo de elemento de la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen et al., Prot. Eng., 10:1-6 (1997) y von Heinje et al., Nucl. Acids. Res., 14:4683-4690 (1986)). Adicionalmente, se reconoce también que, en algunos casos, la división de una secuencia de señal a partir de un polipéptido segregado no es completamente uniforme, lo que resulta en más de una especie segregada. Estos polipéptidos maduros, donde el péptido de señal se divide dentro de no más de alrededor de 5 aminoácidos a cada lado de la frontera en el C terminal del péptido de señal como se identifica en la presente, y los polinucleótidos que los codifican se contemplan por la presente invención.

"Variante de polipéptido IL-17A/F" significa un polipéptido activo IL-17A/F como se define arriba o abajo, que tiene al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de longitud completa del polipéptido de secuencia nativa IL-17A/F como se describe en la presente, una secuencia de polipéptido IL-17A/F que carece del péptido de señal como se describe en la presente, o cualquier otro fragmento de una secuencia de longitud completa de polipéptido IL-17A/F como se describe en la presente. Tales variantes del polipéptido IL-17A/F incluyen, por ejemplo, polipéptidos IL-17A/F en donde se agregan o se eliminan uno o más residuos de aminoácidos, en el "N" o el C

terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. De manera ordinaria, una variante del polipéptido IL-17A/F tendrá al menos alrededor de 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor
5 de 81% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 82% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 83% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 84% de identidad de
10 secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 85% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 86% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 87% de identidad de secuencia de aminoácidos,
15 alternativamente al menos alrededor de 88% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 89% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor
20 de 91% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 92% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 93% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor de 94% de identidad de
25 secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor

de 95% de identidad de secuencia de aminoácidos,
alternativamente al menos alrededor de 96% de identidad de
secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos alrededor
de 97% de identidad de secuencia de aminoácidos,
5 alternativamente al menos alrededor de 98% de identidad de
secuencia de aminoácidos y alternativamente al menos
alrededor de 99% de identidad de secuencia de aminoácidos
para una secuencia de longitud completa del polipéptido de
secuencia nativa IL-17A/F como se describe en la presente,
10 una secuencia de polipéptido IL-17A/F que carece del péptido
de señal como se describe en la presente, o cualquier otro
fragmento específicamente definido de una secuencia de
longitud completa de polipéptido IL-17A/F como se describe en
la presente. De manera ordinaria, los polipéptidos variantes
15 IL-17A/F tienen al menos alrededor de 10 aminoácidos de
longitud, alternativamente al menos alrededor de 20
aminoácidos de longitud, alternativamente al menos alrededor
de 30 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos
alrededor de 40 aminoácidos de longitud, alternativamente al
20 menos alrededor de 50 aminoácidos de longitud,
alternativamente al menos alrededor de 60 aminoácidos de
longitud, alternativamente al menos alrededor de 70
aminoácidos de longitud, alternativamente al menos alrededor
de 80 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos
25 alrededor de 90 aminoácidos de longitud, alternativamente al

menos alrededor de 100 aminoácidos de longitud,
alternativamente al menos alrededor de 150 aminoácidos de
longitud, alternativamente al menos alrededor de 200
aminoácidos de longitud, alternativamente al menos alrededor
5 de 300 aminoácidos de longitud, o más.

"El porcentaje de identidad (%) de secuencia de
aminoácidos" con respecto a las secuencias de polipéptido IL-
17A/F aquí identificadas, se define como el porcentaje de
residuos de aminoácidos en una secuencia candidato que son
10 idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia
específica del polipéptido IL-17A/F, después de alinear
secuencias e introducir espacios, si es necesario, para
lograr la identidad máxima en porcentaje de secuencia, y no
considerando ningunas sustituciones conservadoras como parte
15 de la identidad de secuencia. La alineación para propósitos
de determinar el por ciento de identidad de la secuencia de
aminoácidos se puede lograr de diversas maneras que están
dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, al usar
software de computadora públicamente disponible tales como
20 software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR).
Aquellos expertos en la técnica pueden determinar parámetros
apropiados para medir la alineación, incluyendo algunos
algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima sobre
la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para
25 los propósitos en la presente, sin embargo, los valores de %

de identidad de secuencia de aminoácidos se generan al usar el programa de computadora para alineación de secuencias ALIGN-2, en donde el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 a continuación. El
5 programa de computadora para alineación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 a continuación se ha presentado con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de E.U.A., Washington D.C., 20559, donde se registró bajo el
10 No. de Registro de Autor de E.U.A. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente suministrado en la Tabla 1 a continuación. El programa ALIGN-2 debe compilarse para uso
15 en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde ALIGN-2 se emplea para comparaciones de secuencia de aminoácidos, el % de identidad
20 de secuencia de aminoácidos de una secuencia dada de aminoácidos A para, con, o contra una secuencia dada de aminoácidos B (la cual puede alternativamente nombrarse como una secuencia dada de aminoácidos A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos para,

con, o contra una secuencia dada de aminoácidos B) se calcula como sigue:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

5

donde X es el número de residuos de aminoácidos calificado como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B.

10 Se apreciará que donde la longitud de secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A. Como ejemplos de cálculos de % de
15 identidad de secuencia de aminoácidos al usar este método, las Tablas 2 y 3 demuestran como calcular el % de identidad de secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos designado "Proteína de Comparación" a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido hipotético de interés,
20 "Proteína de Comparación" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido contra la cual se compara el polipéptido de interés, y "X", "Y" y "Z" representan cada uno diferentes residuos de aminoácidos hipotéticos.

A menos que se establezca específicamente de otra
25 manera, todos los valores de % de identidad de secuencia de

aminoácidos usados en la presente se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente antecedente al usar el programa de computadora ALIGN-2. Sin embargo, los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos también se pueden obtener como se describe a continuación al usar el programa de computadora WU-BLAST-2 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se fijan a los valores por omisión. Aquellos que no se fijan a valores por omisión, esto es, los parámetros ajustables, se fijan con los siguientes valores: abertura de traslape = 1, fracción de traslape = 0.125, umbral de palabras (T) = 11, y matriz de calificación = BLOSUM62. Cuando se emplea WU-BLAST-2, un valor de % de identidad de secuencia de aminoácidos se determina al dividir (a) el número de residuos de aminoácidos en coincidencia idéntica entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido de interés que tiene una secuencia derivada del polipéptido nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (esto es, la secuencia contra la cual el polipéptido de interés se compara, la cual puede ser un polipéptido variante IL-17A/F) cuando se determina por WU-BLAST-2 por (b) el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido de interés. Por ejemplo, en la afirmación "un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A la cual tiene al menos 80% de identidad de secuencia de

aminoácidos a la secuencia de aminoácidos B", la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de comparación de la "Proteína de Comparación" de interés y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del polipéptido de interés.

El porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos también se puede determinar al usar el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 también se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> u obtenido de otra manera del Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 usa diversos parámetros de búsqueda, en donde todos esos parámetros de búsqueda se fijan a valores por omisión incluyendo, por ejemplo, descubierto = sí, hebra = todos, presencias esperadas = 10, longitud mínima de baja complejidad = 15/5, valor "e" multi-paso = 0.01, constante para multi-paso = 25, exclusión para alineación final espaciada = 25 y matriz de calificación = BLOSUM62.

En situaciones donde NCBI-BLAST2 se emplea para comparaciones de secuencia de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia dada de aminoácidos A para, con, o contra una secuencia dada de aminoácidos B (la cual puede alternativamente nombrarse como una secuencia dada de aminoácidos A que tiene o comprende un

describe en la presente, o cualquier otro fragmento de una
secuencia de longitud completa de polipéptido IL-17A/F como
se describe en la presente. De manera ordinaria, un
polinucleótido variante IL-17A/F tendrá al menos alrededor de
5 80% de identidad de secuencia de ácido nucleico,
alternativamente al menos alrededor de 81% de identidad de
secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos
alrededor de 82% de identidad de secuencia de ácido nucleico,
alternativamente al menos alrededor de 83% de identidad de
10 secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos
alrededor de 84% de identidad de secuencia de ácido nucleico,
alternativamente al menos alrededor de 85% de identidad de
secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos
alrededor de 86% de identidad de secuencia de ácido nucleico,
15 alternativamente al menos alrededor de 87% de identidad de
secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos
alrededor de 88% de identidad de secuencia de ácido nucleico,
alternativamente al menos alrededor de 89% de identidad de
secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos
20 alrededor de 90% de identidad de secuencia de ácido nucleico,
alternativamente al menos alrededor de 91% de identidad de
secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos
alrededor de 92% de identidad de secuencia de ácido nucleico,
alternativamente al menos alrededor de 93% de identidad de
25 secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos

alrededor de 94% de identidad de secuencia de ácido nucleico,
alternativamente al menos alrededor de 95% de identidad de
secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos
alrededor de 96% de identidad de secuencia de ácido nucleico,
5 alternativamente al menos alrededor de 97% de identidad de
secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos
alrededor de 98% de identidad de secuencia de ácido nucleico
y alternativamente al menos alrededor de 99% de identidad de
secuencia de ácido nucleico con una secuencia de ácido
10 nucleico que codifica una secuencia de longitud completa del
polipéptido de secuencia nativa IL-17A/F como se describe en
la presente, una secuencia de longitud completa del
polipéptido de secuencia nativa IL-17A/F que carece del
péptido de señal como se describe en la presente, o cualquier
15 otro fragmento de una secuencia de longitud completa de
polipéptido IL-17A/F como se describe en la presente. Las
variantes no abarcan la secuencia de nucleótidos nativa.

De manera ordinaria, los polinucleótidos variantes IL-
17A/F tienen al menos alrededor de 30 nucleótidos de
20 longitud, alternativamente al menos alrededor de 60
nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor
de 90 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos
alrededor de 120 nucleótidos de longitud, alternativamente al
menos alrededor de 150 nucleótidos de longitud,
25 alternativamente al menos alrededor de 180 nucleótidos de

longitud, alternativamente al menos alrededor de 210
nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor
de 240 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos
alrededor de 270 nucleótidos de longitud, alternativamente al
5 menos alrededor de 300 nucleótidos de longitud,
alternativamente al menos alrededor de 450 nucleótidos de
longitud, alternativamente al menos alrededor de 600
nucleótidos de longitud, alternativamente al menos alrededor
de 900 nucleótidos de longitud, o más.

10 "Porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido
nucleico" con respecto a la secuencia de ácido nucleicos que
codifica IL-17A/F identificada en la presente, se define como
el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidato que
son idénticos con los nucleótidos en la secuencia de ácido
15 nucleico IL-17A/F de interés, después de alinear las
secuencias e introducir espacios, si es necesario, para
lograr la identidad máxima en porcentaje de secuencia. La
alineación para propósitos de determinar porcentaje de
identidad de secuencias de ácidos nucleicos se puede lograr
20 de diversas maneras que están dentro de la experiencia en la
técnica, por ejemplo, al usar software de computadora
públicamente disponible tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN o
Megalign (DNASTAR). Para los propósitos en la presente, sin
embargo, los valores de % de identidad de secuencia de ácido
25 nucleico se generan al usar el programa de computadora para

alineación de secuencias ALIGN-2, en donde el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 a continuación. El programa de computadora ALIGN-2 para alineación de secuencias fue creado por Genentech, Inc. y el
5 código fuente mostrado en la Tabla 1 a continuación se ha presentado con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de E.U.A., Washington D.C., 20559, donde se registró bajo el No. de Registro de Autor de E.U.A. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible
10 a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 a continuación. El programa ALIGN-2 debe compilarse para uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente digital UNIX V4.0D. Todos los parámetros de
15 comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde ALIGN-2 se emplea para comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una secuencia
20 dada de ácidos nucleicos C para, con, o contra una secuencia dada de ácidos nucleicos D (la cual puede alternativamente nombrarse como una secuencia dada de ácidos nucleicos C que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de ácido nucleico para, con, o contra una secuencia dada de
25 ácidos nucleicos D) se calcula como sigue:

100 veces la fracción W/Z

donde W es el número de nucleótidos calificado como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que donde la longitud de secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de secuencia de ácido nucleico D, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de C a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D a C. Como ejemplos de cálculos de % de identidad de secuencia de ácido nucleico, las Tablas 4 y 5, demuestran como calcular el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico designada "ADN de Comparación" para la secuencia del ácido nucleico designada "IL-17A/F-DNA", en donde "IL-17A/F-DNA" representa una secuencia de ácido nucleico hipotética de interés que codifica el IL-17A/F, "ADN de Comparación" representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico contra la cual la molécula de ácido nucleico de interés de "IL-17A/F-DNA" se compara, y "N", "L" y "V" cada uno representa nucleótidos hipotéticos diferentes.

A menos que se establezca específicamente de otra manera, todos los valores del % de identidad de secuencia de ácido nucleico usados en la presente se obtienen como se

describe en el párrafo inmediatamente precedente al usar el programa de computadora ALIGN-2. Sin embargo, los valores del % de identidad de secuencia de ácido nucleico también se pueden obtener como se describe a continuación al usar el programa de computadora WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se fijan a los valores por omisión. Aquellos que no se fijan a valores por omisión, esto es, los parámetros ajustables, se fijan con los siguientes valores: abertura de traslape = 1, fracción de traslape = 0.125, umbral de palabras (T) = 11, y matriz de calificación = BLOSUM62. Cuando se emplea WU-BLAST-2, un valor de % de identidad de secuencia de ácido nucleico se determina al dividir (a) el número de nucleótidos de coincidencia idéntica entre la secuencia del ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido IL-17A/F de interés, que tiene una secuencia derivada del ácido nucleico que codifica el polipéptido de secuencia nativa IL-17A/F y la comparación de la molécula de ácido nucleico de interés (esto es,, la secuencia contra la cual la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido IL-17A/F de interés se compara el cual puede ser un polinucléotido variante IL-17A/F) cuando se determina por WU-BLAST-2 por (b) el número total de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido IL-17A/F de

interés. Por ejemplo, en la afirmación "una molécula aislada de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácido nucleico A la cual tiene al menos 80% de identidad de secuencia de ácido nucleico con la secuencia del ácido nucleico B", la secuencia del ácido nucleico A es la molécula de comparación del ácido nucleico de interés y la secuencia del ácido nucleico B es la secuencia del ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido IL-17A/F de interés.

El porcentaje de identidad de secuencias de ácidos nucleicos también se puede determinar al usar el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 también se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> u obtenido de otra manera del Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 usa diversos parámetros de búsqueda, en donde todos esos parámetros de búsqueda se fijan a valores por omisión incluyendo, por ejemplo, descubierto = sí, hebra = todos, presencias esperadas = 10, longitud mínima de baja complejidad = 15/5, valor "e" multi-paso = 0.01, constante para multi-paso = 25, exclusión para alineación final espaciada = 25 y matriz de calificación = BLOSUM62.

En situaciones donde NCBI-BLAST2 se emplea para comparaciones de secuencias, el % de identidad de secuencia

de ácido nucleico de una secuencia dada de ácidos nucleicos C para, con, o contra una secuencia dada de ácidos nucleicos D (la cual puede alternativamente nombrarse como una secuencia dada de ácidos nucleicos C que tiene o comprende un
5 determinado % de identidad de secuencia de ácido nucleico para, con, o contra una secuencia dada de ácidos nucleicos D) se calcula como sigue:

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

10

donde W es el número de nucleótidos calificado como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias NCBI-BLAST2 en esa alineación del programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se
15 apreciará que donde la longitud de secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de secuencia de ácido nucleico D, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de C a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D a C.

20 En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes IL-17A/F son moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido activo IL-17A/F y las cuales pueden hibridizar, preferiblemente bajo condiciones de hibridación severa y lavado, a las secuencias de nucleótidos que codifican un
25 polipéptido IL-17A/F de longitud completa como se describe en

la presente. Los polipéptidos variantes IL-17A/F pueden ser aquellos que se codifican por un polinucleótido variante IL-17A/F.

"Aislado," cuando se usa para describir los diversos polipéptidos descritos en la presente, significa el polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían típicamente con los usos terapéuticos y de diagnóstico para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos interna o del terminal N por el uso de un secuenciador de depósito rotatorio, o (2) hasta homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras al usar azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El polipéptido aislado incluye polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del ambiente natural del polipéptido IL-17A/F no estará presente. De manera ordinaria, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Un ácido nucleico que codifica un polipéptido "aislado" IL-17A/F u otro ácido nucleico que codifica el polipéptido es

una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa desde al menos una molécula contaminante de ácido nucleico con la cual se asocia de manera ordinaria en la fuente natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una
5 molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido aislado se otra diferente en la forma o ambiente en el cual se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido aislado se distinguen por lo tanto de la molécula de ácido nucleico que codifica el
10 polipéptido específico como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido aislado incluye moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido contenidas en las células que de manera ordinaria expresan el polipéptido donde, por ejemplo,
15 la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosomal diferente de aquella de las células naturales.

El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación ligada operativamente en un
20 organismo hospedero en particular. Las secuencias de control que son adecuadas para las procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de enlace a ribosomas. Las células eucarióticas se conocen por utilizar promotores, señales de poliadenilación,
25 y potenciadores.

El ácido nucleico se "liga operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una pre-secuencia o líder secretor se liga operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador se liga operativamente a una secuencia de codificación si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de enlace a ribosomas es ligado operativamente a una secuencia de codificación si se coloca de manera de facilitar la traducción. Generalmente, "ligado operativamente" significa que las secuencias de ADN que se ligan son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguo y en fase de lectura. Sin embargo, los intensificadores no tienen que ser contiguos. La ligadura se alcanza por el ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si tales sitios no existen, los adaptadores o ligadura del oligonucleótido sintético se usan de acuerdo con la práctica convencional.

"Severidad" de las reacciones de hibridación se determina fácilmente por alguien experto ordinario en la técnica, y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, temperatura de lavado, y concentración de sal. En general, las sondas más largas requieren de temperaturas superiores para una combinación de pares de bases adecuada, mientras que las sondas más cortas

requieren de temperaturas inferiores. La hibridación generalmente depende de la capacidad del ADN desnaturalizado para recombinar los pares de bases cuando están presentes las hebras complementarias están presentes en un ambiente debajo
5 de su temperatura de fusión. Entre mayor el grado de homología deseado entre la sonda y la secuencia hibridizable, mayor la temperatura relativa a la cual se puede usar. Como resultado, sigue que las temperaturas relativas superiores tenderían a hacer más severas las condiciones de reacción,
10 aunque las temperaturas inferiores lo hacen menos. Para detalles adicionales y explicación de la severidad de las reacciones de hibridación, ver Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

15 "Condiciones severas" o "condiciones de alta severidad", como se define en la presente, se puede identificar por aquellos como: (1) emplear una baja fuerza iónica y alta temperatura para lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0.015 M /citrato de sodio 0.0015 M /dodecil sulfato de sodio 0.1% a
20 50°C; (2) emplear durante la hibridación un agente desnaturalizante, tales como formamida, por ejemplo, 50% (v/v) formamida con 0.1% albúmina de suero de bovino/0.1% Ficoll/0.1% polivinilpirrolidona/50mM de solución amortiguadora de fosfato de sodio a un pH 6.5 con cloruro de
25 sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C; o (3) emplear

50% formamida, 5 x SSC (0.75M NaCl, 0.075M citrato de sodio), 50 mM fosfato de sodio (pH 6.8), 0.1% de pirofosfato de sodio, solución de Denhardt 5 x, ADN sonificado de esperma de salmón (50 µg/ml), 0.1% SDS, y 10% sulfato de dextrano a 42EC, con lavados a 42°C en 0.2 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) y 50% formamida a 55°C, seguido por un lavado de alta severidad que consiste de 0.1 x SSC que contienen EDTA a 55°C.

"Condiciones moderadamente severas" se pueden identificar como se describen por Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de la solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y %SDS) menos severas que aquellas antes descritas. Un ejemplo de condiciones moderadamente severas es la incubación durante la noche a 37°C en una solución que comprende: 20% formamida, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM tricitrato de sodio), 50 mM fosfato de sodio (pH 7.6), 5 x solución de Denhardt, 10% sulfato de dextrano, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado, seguido por lavado de los filtros en 1 x SSC a alrededor de 37-50°C. El técnico experimentado reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. como sea necesario para ajustar factores tales como longitud de la sonda y los similares.

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

15 Como se usa en la presente, el término "inmunoadhesina" designa moléculas de tipo anticuerpo las cuales combinan la especificidad de enlace de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones de efector de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las
20 inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de enlace deseada la cual es diferente al reconocimiento de antígeno y sitio de enlace de un anticuerpo (esto es, es "heterólogo"), y una secuencia de un dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina
25 de una molécula de inmunoadhesina típicamente es una

secuencia contigua de aminoácidos que comprende al menos el sitio de enlace de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener de cualquier inmunoglobulina, tales como
5 subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD o IgM.

El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquee parcial o completamente, inhiba o neutralice una actividad biológica de
10 un polipéptido IL-17A/F nativo aquí descrito. De una manera similar, el término "agonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica de un polipéptido IL-17A/F nativo aquí descrito. Las moléculas adecuadas de agonista o antagonista
15 específicamente incluyen anticuerpos agonistas o antagonistas o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos IL-17A/F nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Los métodos para identificar agonistas o
20 antagonistas de un polipéptido IL-17A/F pueden comprender poner en contacto un polipéptido IL-17A/F con una molécula candidato agonista o antagonista y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido IL-17A/F.

"Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico y medidas profiláticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir o hacer más lento (disminuir) la condición o trastorno patológico objetivo. Aquellos que necesitan de
5 tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en quienes se va a evitar el trastorno.

La administración "crónica" se refiere a la administración del agente(s) en un modo continuo en lo
10 opuesto a un modo agudo, de manera de mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) por un periodo de tiempo prolongado. La administración "intermitente" es el tratamiento que no se hace constitutivamente sin interrupción, sino más bien es cíclico en naturaleza.

15 "Mamífero" para los propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y de zoológico, deportivos, o mascotas, tales como perros, gatos, reses, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc.
20 Preferiblemente, el mamífero es humano.

La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

Los "portadores" como se usa en la presente incluyen
25 portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes, o

estabilizadores los cuales no son tóxicos para la célula o mamífero que se expone a ellos en las dosis y concentraciones empleadas. A menudo el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa amortiguada en el pH. Ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes queladores tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraponos formadores de sales tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS™.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales simples anti-IL-17A/F (incluyendo agonista, antagonista, y anticuerpos neutralizantes), composiciones de anticuerpos anti-IL-17A/F con especificidad poliepitópica (por ejemplo anticuerpos biespecíficos con tal de que muestren la actividad biológica deseada), anticuerpos

policlonales, anticuerpos de cadena sencilla anti-IL-17A/F, y fragmentos de anticuerpos anti-IL-17A/F (ver a continuación) con tal de que muestren la actividad biológica o inmunológica deseada. El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa de manera
5 intercambiable con el anticuerpo en la presente.

Un "anticuerpo aislado" es uno el cual se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían con usos
10 terapéuticos o de diagnóstico para el anticuerpo, y puede incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95% en peso de anticuerpo cuando se determina por el método Lowry, y lo más preferiblemente más
15 de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de N terminal o secuencia interna de aminoácidos por el uso de un secuenciador de depósito giratorio, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras al usar azul de
20 Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. De manera ordinaria, sin embargo, el anticuerpo aislado se
25 preparará por al menos una etapa de purificación.

La unidad básica de anticuerpos de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste de 5 de las unidades básicas de heterotetrámero junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y por lo tanto contiene 10 sitios de enlace a antígenos, mientras que los anticuerpos segregados IgA se pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes que comprende 2-5 de las unidades básicas de 4 cadenas. En el caso de IgGs, la unidad de 4 cadenas es generalmente alrededor de 150,000 daltones. Cada cadena L se liga a una cadena H por un enlace bisulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se ligan una con la otra por uno o más enlaces de bisulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes de bisulfuro entre cadenas espaciados regularmente. Cada cadena H tienen en el N terminal, un dominio variable (V_H) seguido por tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en la terminación N, un dominio variable (V_L) seguido por un dominio constante (C_L) en su otro extremo. La V_L se alinea con la V_H y la C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada ($C_H - 1$). Los residuos de aminoácidos en particular se cree que forman una interfaz entre los dominios variables de cadena pesada y de cadena ligera. El

apareamiento de un V_H y V_L junto forma un sitio de enlace a antígeno sencillo. Para la estructura y propiedades de los diferentes tipos de anticuerpos, ver, por ejemplo, Basic y Clinical Immunology, 8^a. edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

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

El término "variable" se refiere al hecho de que determinados segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre los anticuerpos. El dominio V media el enlace a antígenos y define especificidad de un anticuerpo en particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variación no se distribuye uniformemente a través

del espacio de 110 aminoácidos de los dominios variables. En su lugar, las regiones V consisten de extensiones relativamente sin variante denominadas regiones de estructura (FRs) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variación extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una 9-12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de cadenas ligera y pesada nativos, comprenden cada uno cuatro FRs, que adoptan mayormente una configuración de lámina β , conectada por tres regiones hipervariables, las cuales forman rizos de conexión, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena, se mantienen juntas en proximidad cercana por las FRs y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de enlace a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no se involucran directamente en enlazar a un anticuerpo a un antígeno, sino que muestran diversas funciones del efector, tales como participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC).

El término "región hipervariable" cuando se usa en la presente se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo los cuales son responsables del enlace a

antígenos. La región hipervariable generalmente comprende
residuos de aminoácidos de una "región determinante de la
complementariedad" o "CDR" (por ejemplo alrededor de los
residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la V_L, y
5 alrededor de 1-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en la V_H;
Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological
Interest, 5^a. Ed. Public Health Service, National Institutes
de Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un
"rizo hipervariable " (por ejemplo residuos 26-32 (L1), 50-52
10 (L2) y 91-96 (L3) en la V_L, y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101
(H3) en la V_H; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917
(1987)).

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la
presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una población
15 de anticuerpos sustancialmente homogéneos, esto es, los
anticuerpos individuales que comprenden la población son
idénticos, excepto por las posibles mutaciones que se
presentan naturalmente, que pueden estar presentes en
cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son
20 altamente específicos, se dirigen contra un sitio antigénico
sencillo. Adicionalmente, en contraste con las preparaciones
de anticuerpos policlonales las cuales incluyen diferentes
anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes
(epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un
25 determinante sencillo sobre el antígeno. Además de su

especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se pueden sintetizar sin contaminar por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no se debe constituir como que requiere de la producción del anticuerpo
5 por algún método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención se pueden preparar por la metodología del hibridoma primero descrita por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), o se pueden hacer al usar métodos de ADN recombinante en células bacterianas,
10 animales eucarióticas o de plantas (ver, por ejemplo, patente de E.U.A. No. 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar a partir de colecciones de anticuerpos de fagos al usar las técnicas descritas en Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks et al.,
15 J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales incluyen en la presente anticuerpos "quimérico" en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una
20 especie en particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de las cadenas es idéntico con u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así
25 como fragmentos de tales anticuerpos, con tal de que muestren

la actividad biológica deseada (ver patente de E.U.A. No. 4,816,567; y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente incluyen anticuerpos "primatizados" que
5 comprenden secuencias de enlace a antígenos de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo mono del Viejo Mundo, simio etc), y secuencias humanas de región constante.

Un anticuerpo "intacto" es uno el cual comprende un
10 sitio de enlace a antígeno así como un C_L y al menos dominios constantes de cadena pesada, C_H 1, C_H 2 y C_H 3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencias nativas (por ejemplo dominios constantes de secuencia nativa humana) o variante de la secuencia de aminoácidos del mismo.
15 Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones del efector.

"Fragmentos de anticuerpos" comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región del enlace a antígenos o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de
20 fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (ver patente de E.U.A. No. 5,641,870, Ejemplo 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados de
25 fragmentos de anticuerpos.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de enlace a antígenos, denominados fragmentos "Fab", y un fragmento residual "Fc", una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste de una cadena completa L junto con el dominio de región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_H 1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto al enlace de antígeno, esto es, tiene un sitio de enlace a antígeno sencillo. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un fragmento grande sencillo $F(ab')_2$ el cual aproximadamente corresponde a dos fragmentos Fabs ligados a bisulfuro que tienen actividad de enlace a antígenos divalente y todavía pueden reticular al antígeno. Los fragmentos Fab' difieren del fragmento Fabs por que tienen pocos residuos adicionales en la terminación carboxi del dominio C_H 1 incluyendo una o más cisteínas desde la región de articulación del anticuerpo. $Fab'-SH$ es la designación en la presente para Fab' en la cual los residuos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' los cuales tienen cisternas de articulación entre ellos. Otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos también se conocen.

El fragmento Fc comprende las porciones en la terminal carboxi de ambas cadenas H mantenidas en conjunto por los bisulfuros. Las funciones del efector de anticuerpos se determinaron por secuencias en la región Fc, región la cual
5 también es la parte reconocida por los receptores Fc (FcR) encontrados en ciertos tipos de células.

"Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpos el cual contiene un sitio de enlace y de reconocimiento a antígenos completo. Este fragmento consiste de un dímero de un dominio
10 de región variable de cadena ligera y uno de cadena pesada en asociación firme, no covalente. A partir del pliegue de estos dos dominios, emanan seis rizados hipervariables (3 rizados cada uno de la cadena H y L) que contribuyen los residuos de aminoácidos para enlace a antígenos y confieren especificidad
15 de enlace a antígenos para el anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable sencillar (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDRs específicos para el antígeno) tiene la capacidad de reconocer y enlazar el antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de enlace completo.

20 "Fv de cadena sencilla" también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios de anticuerpos V_H y V_L conectados en una cadena sencilla de polipéptidos. Preferiblemente, el polipéptido sFv comprende además una ligadura de un polipéptido entre los
25 dominios V_H y V_L lo cual permite que el sFv forme la

estructura deseada para enlace a antígenos. Para una revisión de sFv, ver Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, infra.

5 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpos preparados al construir fragmentos de sFv (ver párrafo anterior) con ligaduras cortas (alrededor de 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L tal que se alcanza el apareamiento entre cadenas pero no intra-cadenas de los dominios V, lo que resulta en un fragmento bivalente, esto es, fragmento que tiene dos sitios de enlace a antígenos. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "transversales" en los cuales los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas de polipéptidos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por los residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tales como ratón,

rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas de anticuerpos. En algunos casos, los residuos de la región de estructura (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se hacen para refinar además el desempeño del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todo o sustancialmente todos los rizados hipervariables corresponden con aquellos de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los FRs son aquellos de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana. Para mayores detalles, ver Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

Un "anticuerpo dependiente de la especie", por ejemplo, un anticuerpo mamífero anti-humano IgE, es un anticuerpo el cual tiene una afinidad de enlace más fuerte para un antígeno de una primera especie mamífera que la que tiene para un

homólogo de ese antígeno de una segunda especie mamífera. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie "se enlaza específicamente" a un antígeno humano (esto es, tiene un valor de afinidad de enlace (K_d) de no más de alrededor de 1×10^{-7} M, preferiblemente no más de alrededor de 1×10^{-8} y más preferiblemente no más de alrededor de 1×10^{-9} M) pero tiene una afinidad de enlace para un homólogo del antígeno de una segunda especie mamífera no humana el cual es al menos alrededor de 50 veces, o al menos alrededor de 500 veces, o al menos alrededor de 1000 veces, más débil que su afinidad de enlace para el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser de cualquiera de diversos tipos de anticuerpos como se define anteriormente, pero es preferiblemente un anticuerpo humano o humanizado.

Un "oligopéptido de enlace a IL-17A/F" es un oligopéptido que enlaza, preferiblemente específicamente, a un polipéptido IL-17A/F como se describe en la presente. Los oligopéptidos de enlace a IL-17A/F se pueden sintetizar químicamente al usar metodologías de síntesis de oligopéptidos conocidas o se pueden preparar y purificar al usar tecnología recombinante. Los oligopéptidos de enlace a IL-17A/F tienen usualmente al menos alrededor de 5 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35,

36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50,
51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65,
66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80,
81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95,
5 96, 97, 98, 99, o 100 aminoácidos de longitud o más, en donde
tales oligopéptidos pueden enlazar, preferiblemente
específicamente, a un polipéptido IL-17A/F como se describe
en la presente. Los oligopéptidos de enlace a IL-17A/F se
pueden identificar sin experimentación indebida al usar
10 técnicas bien conocidas. A este respecto, se observa que las
técnicas para selección de colecciones de oligopéptidos para
oligopéptidos que pueden enlazar específicamente a un
objetivo de polipéptido son bien conocidas en la técnica
(ver, por ejemplo, patente de E.U.A. Nos. 5,556,762,
15 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484,
5,571,689, 5,663,143; publicaciones PCT Nos. WO 84/03506 y
WO84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,
81:3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci.
U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen et al., in Synthetic
20 Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J.
Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs et al., J.
Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B. et al.
(1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. et al. (1991)
25 Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol.,

222:581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
88:8363, y Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol.,
2:668).

Una "molécula orgánica de enlace a IL-17A/F" es una
5 molécula orgánica diferente a un oligopéptido o anticuerpo
como se define en la presente que enlaza, preferiblemente
específicamente, a un polipéptido IL-17A/F como se describe
en la presente. Las moléculas orgánicas de enlace a IL-17A/F
se pueden identificar y sintetizar químicamente al usar
10 metodología conocida (ver, por ejemplo, publicaciones PCT
Nos. WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas de
enlace a IL-17A/F tienen usualmente menos de alrededor de
2000 daltones de tamaño, alternativamente menos de alrededor
de 1500, 750, 500, 250 o 200 daltones de tamaño, en donde
15 tales moléculas orgánicas que pueden enlazar, preferiblemente
específicamente, a un polipéptido IL-17A/F como se describe
en la presente se pueden identificar sin experimentación
indebida al usar técnicas bien conocidas. A este respecto, se
observa que las técnicas para selección de colecciones de
20 moléculas orgánicas para moléculas que puedan enlazar a un
objetivo de polipéptido son bien conocidas en la técnica
(ver, por ejemplo, publicaciones PCT Nos. WO00/00823 y
WO00/39585).

Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica "la
25 cual enlaza" un antígeno de interés, por ejemplo un objetivo

de antígeno de polipéptido asociado con tumor, es uno que enlaza el antígeno con suficiente afinidad tal que el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica es útil como un agente terapéutico y/o de diagnóstico al dirigirse a una célula o tejido que expresa el antígeno, y no reacciona de forma cruzada significativamente con otras proteínas. En tales realizaciones, el grado de enlace del anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a una proteína "no objetivo" será menos que alrededor de 10% del enlace del anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a su proteína objetivo en particular cuando se determina por análisis de selección de células activado por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). Con respecto al enlace de un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a una molécula objetivo, el término "enlace específico" o "específicamente se enlaza a" o es "específico para" un polipéptido en particular o un epítipo sobre un objetivo de polipéptido en particular significa el enlace que es mesurablemente diferente de una interacción no específica. El enlace específico se puede medir, por ejemplo, al determinar el enlace de una molécula comparado con el enlace de una molécula de control, la cual es generalmente una molécula de estructura similar que no tiene actividad de enlace. Por ejemplo, el enlace específico se puede determinar por competencia con una molécula de control que

sea similar al objetivo, por ejemplo, un exceso de objetivo no etiquetado. En este caso, el enlace específico se indica si el enlace del objetivo etiquetado a una sonda se inhibe competitivamente por un objetivo no etiquetado en exceso. El

5 término "enlace específico" o "específicamente se enlaza a" o es "específico para" un polipéptido en particular o un epítipo sobre un objetivo de un polipéptido en particular como se usa en la presente se puede mostrar, por ejemplo, por una molécula que tiene una K_d para el objetivo de al menos

10 alrededor de 10^{-4} M, alternativamente al menos alrededor de 10^{-5} M, alternativamente al menos alrededor de 10^{-6} M, alternativamente al menos alrededor de 10^{-7} M, alternativamente al menos alrededor de 10^{-8} M, alternativamente al menos alrededor de 10^{-9} M,

15 alternativamente al menos alrededor de 10^{-10} M, alternativamente al menos alrededor de 10^{-11} M, alternativamente al menos alrededor de 10^{-12} M, o mayor. En una realización, el término "enlace específico" se refiere al enlace donde una molécula se enlaza a un polipéptido en

20 particular o epítipo sobre un polipéptido en particular sin enlazar sustancialmente a algún otro polipéptido o epítipo de polipéptido.

Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que "inhibe el crecimiento de células de tumor que expresan un

25 polipéptido IL-17A/F" o un anticuerpo "inhibidor del

crecimiento", oligopéptido u otra molécula orgánica es uno el cual resulta en una inhibición de crecimiento medible de células de cáncer que expresan o sobreexpresan el polipéptido IL-17A/F apropiado. Los anticuerpos inhibidores del crecimiento anti-IL-17A/F preferidos, oligopéptidos o moléculas orgánicas que inhiben el crecimiento de células de tumor que expresan IL-17A/F por más del 20%, preferiblemente desde alrededor de 20% a alrededor de 50%, e incluso más preferiblemente, por más del 50% (por ejemplo, desde alrededor de 50% a alrededor de 100%) en comparación con el control apropiado, el control es típicamente células de tumor no tratadas con el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que se pruebe. En una realización, la inhibición del crecimiento se puede medir en una concentración del anticuerpo de alrededor de 0.1 a 30 µg/ml o alrededor de 0.5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células de tumor al anticuerpo. La inhibición del crecimiento de células de tumor *in vivo* se puede determinar de diversas maneras. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti-IL-17A/F a alrededor de 1 µg/kg hasta alrededor de 100 mg/kg de peso corporal resulta en una reducción en el tamaño del tumor o proliferación de células de tumor dentro de alrededor de 5 días a 3 meses desde la primera administración del

anticuerpo, preferiblemente dentro de alrededor de 5 a 30 días.

Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica el cual "induce la apoptosis" es uno el cual induce la muerte celular programada cuando se determina por enlace de anexina V, fragmentación de ADN, encogimiento de células, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación de células, y/o formación de vesículas de membrana (denominados cuerpos apoptóticos). La célula es usualmente una la cual sobreexpresa un polipéptido IL-17A/F. Preferiblemente la célula es una célula de tumor, por ejemplo, una célula de próstata, mama, ovario, estómago, matriz, pulmón, riñón, colon, vejiga. Están disponibles diversos métodos para evaluar los eventos celulares asociados con apoptosis. Por ejemplo, la translocalización de fosfatidil serina (PS) se puede medir por enlace de anexina, la fragmentación del ADN se puede evaluar a través de escalonamiento del ADN; y la condensación nuclear/de cromatina junto con la fragmentación del ADN, se puede evaluar por cualquier incremento en las células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica la cual induce la apoptosis es una la cual resulta en alrededor de 2 a 50 veces, preferiblemente alrededor de 5 a 50 veces, y lo más preferiblemente alrededor de 10 a 50 veces, la inducción del

enlace de anexina con relación a la célula sin tratar en un ensayo de enlace con anexina.

Las "funciones de efector" del anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas que se atribuyen a la región Fc (una región de secuencia nativa Fc o región variante de secuencia de aminoácidos Fc) de un anticuerpo, y varían con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones de efector de anticuerpos incluyen: enlace de C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; enlace del receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; sub-regulación de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; y activación de células B.

"La citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos " o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual la Ig secretada enlazada sobre los receptores Fc (FcRs) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células exterminadoras naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permiten a estas células efectoras citotóxicas enlazar específicamente a una célula objetivo que lleva un antígeno y posteriormente exterminar a la célula objetivo con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y se requieren absolutamente para tal exterminio. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan solamente FcγRIII, mientras que los

monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en las células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, un ensayo *in vitro* de ADCC, tal como aquel descrito en la patente de E.U.A. No. 5,500,362 o 5,821,337 se puede efectuar. Las células de efector útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células exterminadoras naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tales como aquellos descritos en Clynes et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:652-656 (1998).

"El receptor Fc" o "FcR" describe un receptor que se enlaza a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Más aún, un FcR preferido es uno el cual se enlaza a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) y incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y alternativamente formas empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), los cuales tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor activador

FcγRIIA contiene una porción de activación basada en la tirosina del inmunoreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene una porción de inhibición basada en la tirosina del
5 inmunoreceptor (ITIM) en su dominio citoplásmico. (ver revisión M. in Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcRs se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41
10 (1995). Otros FcRs, incluyendo aquellos a identificarse en el futuro, se abarcan por el término "FcR" en la presente. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, el cual es responsable de la transferencia de las IgGs maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al.,
15 J. Immunol. 24:249 (1994)).

"Las células efectoras humanas" son leucocitos los cuales expresan uno o más FcRs y efectúan funciones del efector. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo la función del efector ADCC.
20 Ejemplos de leucocitos humanos los cuales median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células exterminadoras naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; siendo preferidas las PBMCs y

células NK. Las células del efector se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

"La citotoxicidad dependiente del complemento " o "CDC" se refiere a la lisis de una célula objetivo en la presencia de complemento. La activación de la trayectoria clásica del
5 complemento se inicia por el enlace del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada) los cuales se enlazan a su antígeno similar. Para evaluar la activación del complemento, se puede
10 efectuar un ensayo CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

La palabra "etiqueta" cuando se usa en la presente se refiere a un compuesto o composición detectable el cual se conjuga directamente o indirectamente al anticuerpo de manera
15 de generar un anticuerpo "etiquetado". La etiqueta puede ser detectable por sí misma (por ejemplo etiquetas de radioisótopo o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato el cual sea
20 detectable.

Por "fase sólida" significa una matriz no acuosa a la cual se puede adherir el anticuerpo de la presente invención. Ejemplos de fase sólidas abarcadas en la presente incluyen aquellas formadas parcialmente o completamente de vidrio (por
25 ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por

ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y silicones. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pozo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía por afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como aquellas descritas en la patente de E.U.A. No. 4,275,149.

Una "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivo la cual es útil para el suministro de un fármaco (tales como un polipéptido IL-17A/F o anticuerpos para ello) a un mamífero. Los componentes de la liposoma se configuran comúnmente en una formación en bicapa, similar a la configuración de lípidos de las membranas biológicas.

Una "molécula pequeña" se define en la presente por tener un peso molecular debajo de alrededor de 500 Daltones.

El término "modular" significa afectar (por ejemplo, ya sea sub-regular, sobre-regular o controlar de otra manera) el nivel de una trayectoria de señalización. Los procesos celulares bajo el control de la transducción de señal incluyen, pero no se limitan a, transcripción de genes específicos, funciones celulares normales, tales como metabolismo, proliferación, diferenciación, adhesión,

apoptosis y supervivencia, así como procesos anormales, tales como transformación, bloqueo de diferenciación y metástasis.

"Activo" o "actividad" para los propósitos en la presente se refiere a forma(s) de un polipéptido IL-17A/F las
5 cuales retienen una actividad biológica y/o inmunológica de polipéptidos IL-17A/F nativos o que se presentan naturalmente, en donde la actividad "biológica" se refiere a una función biológica (ya sea inhibidora o estimuladora) provocada por un polipéptido IL-17A/F nativo o que se
10 presenta naturalmente diferente a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un polipéptido IL-17A/F nativo o que se presenta naturalmente y una actividad "inmunológica" se refiere a la capacidad de inhibir la producción de un anticuerpo contra un
15 epítipo antigénico poseído por un polipéptido IL-17A/F nativo o que se presenta naturalmente. Una actividad biológica preferida incluye inducir la activación de NF- κ B y la estimulación de la producción de las quimiocinas proinflamatorias IL-8 e IL-6. Otra actividad biológica
20 preferida incluye la estimulación de células mononucleares de sangre periférica o células CD4⁺. Otra actividad biológica preferida incluye la estimulación de la proliferación de linfocitos "T". Otra actividad biológica preferida incluye, por ejemplo, la liberación de TNF- α de células THP1. Otra
25 actividad incluye una intensificación de la síntesis de

matriz en el cartílago articular. Alternativamente, otra actividad incluye promover el rompimiento de la matriz del cartílago articular así como inhibir la síntesis de matriz. Otra actividad biológica preferida incluye modular el nivel
5 de la trayectoria de señalización de la interleucina 17 durante las etapas moderadas a severas de la enfermedad inflamatoria del intestino o durante la apoplejía.

Una actividad "inmunológica" se refiere solamente a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un
10 epítipo antigénico poseído por un polipéptido IL-17A/F nativo o que se presenta naturalmente.

"Trastorno degenerativo de los cartílagos" describe un alojamiento de trastornos que se caracteriza principalmente por la destrucción de la matriz del cartílago. Las patologías
15 adicionales incluyen producción de ácido nítrico y rompimiento elevado de los proteoglicanos. Trastornos ejemplares abarcados dentro de esta definición, incluyen, por ejemplo, artritis (por ejemplo, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis psoriática).

20 El término "enfermedad relacionada con lo inmune" significa una enfermedad en la cual un componente del sistema inmune de un mamífero provoca, media o contribuye de otra manera a la morbilidad en el mamífero. También se incluyen enfermedades en las cuales la estimulación o intervención de
25 la respuesta inmune tiene un efecto mejorador en el avance de

la enfermedad. Se incluyen dentro de este término, enfermedades inflamatorias mediadas por lo inmune, enfermedades inflamatorias no mediadas por lo inmune, enfermedades infecciosas, enfermedades por inmunodeficiencia,
5 neoplasia, etc.

El término "Enfermedad mediada por células T" significa una enfermedad en la cual las células T directamente o indirectamente median o contribuyen de otra forma a la morbilidad en un mamífero. La enfermedad mediada por células
10 T se puede asociar con efectos mediados por células, efectos mediados por linfocinas, etc., e incluso efectos asociados con células B si las células B se estimulan, por ejemplo, por las linfocinas secretadas por las células T.

Ejemplos de enfermedades inflamatorias y relacionadas
15 con lo inmune, algunas de las cuales son mediadas por células T o por lo inmune, las cuales se pueden tratar de acuerdo con la invención incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis juvenil crónica, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (escleroderma), miopatías inflamatorias
20 idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxismal nocturna), trombocitopenia autoinmune (púrpura idiopático trombocitopénico, trombocitopenia mediada por lo inmune),
25 tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto,

tiroiditis juvenil linfocítica, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por lo inmune (glomerulonefritis, nefritis túbulo-intersticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otro virus no hepatotrópicos), hepatitis activa crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y colangitis esclerotizante, enfermedad inflamatoria del intestino (colitis ulcerante: enfermedad de Crohn), enteropatía sensible al gluten, y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel mediadas por lo inmune o autoinmunes incluyendo enfermedades de la piel bulosa, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a alimentos y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón tales como neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas con transplantes incluyendo rechazo de injertos y enfermedad de injerto contra huésped. Las enfermedades infecciosas incluyen enfermedades virales tales como SIDA (infección por VIH), hepatitis A, B,

C, D, y E, herpes, etc., infecciones bacterianas, infecciones fúngicas, infecciones por protozoarios e infecciones por parásitos. El término "cantidad efectiva" es una concentración o cantidad de un polipéptido IL-17A/F y/o
5 agonista/antagonista la cual resulta en alcanzar un propósito establecido en particular. Una "cantidad efectiva" de un polipéptido IL-17A/F o agonista o antagonista del mismo puede determinarse empíricamente. Adicionalmente, una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una concentración o cantidad de
10 un polipéptido IL-17A/F y/o agonista/antagonista la cual es efectiva para lograr el efecto terapéutico establecido. Esta cantidad también se puede determinar empíricamente.

El término "agente citotóxico" como se usa en la presente se refiere a una sustancia que inhibe o previene la
15 función de las células y/o provoca la destrucción de las células. El término se pretende que incluya isótopos radioactivos (por ejemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de
20 plantas o animales, o fragmento de las mismas.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, citosina arabinósido ("Ara-C"),
25 ciclofosfamida, tiotepa, busulfan, citoxina, taxoides, por

ejemplo, paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), y doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia), toxotere, metotrexato, cisplatina, melfalan, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatina, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterín, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (ver patente de E.U.A. No. 4,675,187), melfalan y otras mostazas de nitrógeno relacionadas. También se incluyen en esta definición agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas sobre tumores tales como tamoxifen y onapristona.

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en la presente se refiere a un compuesto o composición la cual inhibe el crecimiento de una célula, especialmente células de cáncer que sobreexpresan cualquiera de los genes identificados en la presente, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento es uno el cual reduce significativamente el porcentaje de células que sobreexpresan tales genes en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean el avance del ciclo celular (en un lugar diferente a la fase S), tales como agentes que inducen la suspensión de G1 y la suspensión en la fase M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxol, e inhibidores topo

II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Aquellos agentes que suspenden G1 también se extienden sobre la suspensión de la fase S, por ejemplo, agentes de alquilación del ADN tales como tamoxifen, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Mayor información se puede encontrar en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Regulación del ciclo celular, oncogenes y fármacos anti-neoplásicos " por Murakami et al., (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente p. 13.

El término "citoquina" es un término genérico par alas proteínas liberadas por una población celular la cual actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citoquinas son las linfoquinas, monocinas, y las hormonas tradicionales de polipéptido. Se incluyen entre las citoquinas la hormona del crecimiento tales como hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano de N-metionilo, y hormona del crecimiento de bovinos; hormona paratiroides; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas tales como hormona estimuladora del folículo (FSH), hormona estimuladora de la tiorides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno de placenta; factor α y β de necrosis

de tumor; sustancia de inhibición mulleriana; péptido asociado con la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); factores de crecimiento de los nervios tales como NGF- β ; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformadores (TGFs) tales como TGF- α y TGF- β ; factor I y II de crecimiento del tipo insulina; eritropoietina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón α , β , y γ ; factores estimuladores de las colonias (CSFs) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, o IL-17; un factor de necrosis de tumor tales como TNF- α o TNF- β ; y otros factores de polipéptidos que incluyen el factor inhibidor de la leucemia (LIF) y ligando de kit (KL). Como se usa en la presente, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

Tabla 1

```
/*
*
* C-C se incrementa desde 12 a 15
* Z es el promedio de EQ
* B es el promedio de ND
* coincidencia con el paro es _M; paro-paro = 0; J (comodín) coincidencia = 0
*/
#define _M -8 /* valor de una coincidencia con un paro */

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

20

25

Tabla 1 (cont')

```

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

#define MAXJMP      16      /* saltos max en una diag */
#define MAXGAP      24      /* no continuar penalización de espacios mayores que este */
#define JMPS        1024    /* max jmps en una trayectoria */
#define MX          4       /* guardar si hay al menos MX-1 bases desde el último jmp */

5  #define DMAT      3       /* valor de bases coincidentes */
    #define DMIS      0       /* penalización por bases sin coincidencia */
    #define DINS0      8       /* penalización para un espacio */
    #define DINS1      1       /* penalización por base */
    #define PINS0      8       /* penalización para un espacio */
    #define PINS1      4       /* penalización por residuo */

    struct jmp {
        corto      n[MAXJMP]; /* tamaño de jmp (neg para dely) */
        corto sin ident x[MAXJMP]; /* base no. de jmp en seq x */
    }; /* limita seq a 2^16 -1 */

10  struct diag {
    int      calificación; /* calificación en último jmp */
    largo    compensación; /* compensación de bloque prev */
    corto    ijmp; /* índice actual de jmp */
    struct jmp jp; /* lista de jmps */
};

    struct trayectoria {
    int      spc; /* número de espacios guía */
    corto    n[JMPS]; /* tamaño de jmp (espacio) */
    int      x[JMPS]; /* lugar de jmp (último elem antes de espacio) */
};

15  car      *oarchivo; /* nombre de archivo de salida */
    car      *nombre x[2]; /* nombres de seq: obtener seqs() */
    car      *prog; /* prog nombre para mensajes de error */
    car      *seqx[2]; /* seqs: obtener seqs() */
    int      dmax; /* mejor diag: nw() */
    int      dmax0; /* final diag */
    int      adn; /* fijar si adn: principal() */
    int      espacios terminales; /* fijar si penaliza espacios terminales */
    int      espacio x, espacio y; /* espacios totales en seqs */
    int      len0, len1; /* lente seq */
20  int      ngapx, ngapy; /* tamaño total de espacios */
    int      smax; /* calificación max: nw() */
    int      *xbm; /* mapa de bits para coincidencia */
    largo    compensación; /* compensación actual en archivo jmp */
    struct diag *dx; /* mantiene diagonales */
    struct path pp[2]; /* mantiene trayectoria para seqs */

    car      *calloc(), *malloc(), *índice(), *strcpy();
    car      *obtener seq(), *g_calloc();

```

25

Tabla 1 (cont')

```
/* programa de alineación Needleman-Wunsch
*
* uso: progs archivo1 archivo2
* donde archivo1 y archivo2 son dos adn o dos secuencias de proteínas.
* Las secuencias pueden iniciar en mayúsculas o en minúsculas y pueden contener ambigüedad
* Algunas líneas que comienzan con ';', '>' o '<' se ignoran
* Longitud max de archivo es 65535 (limitada por el corto x sin identificar en la estructura jmp)
* Una secuencia con 1/3 or más de sus elementos ACGTU se asume por ser ADN
* Salida es en el archivo "align.out"
*
5
* El programa puede crear un archivo tmp en /tmp para retener la info sobre el rastreo.
* Versión original desarrollada bajo BSD 4.3 en un vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "dia.h"

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

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

principal(ac, av)
    int    ac;
    char   *av[];
{
15
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fimprimirf(stderr, "uso: %s archivo1 archivo2\n", prog);
        fimprimirf(stderr, "donde archivo1 y archivo2 son dos adn o dos secuencias de proteínas.\n");
        fimprimirf(stderr, "Las secuencias pueden eestrella en mayúsculas o en minúsculas\n");
        fimprimirf(stderr, "Algunas líneas que comienzan con ';' o '<' se ignoran\n");
        fimprimirf(stderr, "Salida está en el archivo \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    nombrex[0] = av[1];
    nombrex[1] = av[2];
    seqx[0] = obtener seq(nombrex[0], &len0);
    seqx[1] = obtener seq(nombrex[1], &len1);
20
    xbm = (adn)? _dbval : _pbval;

    espacios terminales = 0;          /* 1 para penalizar espacios terminales */
    oarchivo = "align.out";          /* archivo de salida */

    nw();          /* llenar en la matriz, obtener los posibles jmps */
    readjmps();    /* obtener los jmps actuales */
    imprimir();     /* imprimir stats, alineación */

    limpieza(0);   /* no ligar ningunos archivos tmp */
}

25
```

principal

Tabla 1 (cont')

```

/* hacer la alineación, regresar la mejor calificación: principal()
* adn: valores en Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: valores PAM 250
* Cuando son iguales las calificaciones, se prefieren las no coincidencias a algún espacio, preferir
* un nuevo espacio para extender un espacio continuo, y preferir un espacio en seqx
* a un espacio en seq y.
*/

5 nw()
{
    car          *px, *py;                /* seqs y ptrs */
    int          *ndely, *dely;           /* observar dely */
    int          ndelx, delx;             /* observar delx */
    int          *tmp;                   /* para intercambiar hilera0, hilera1 */
    int          mis;                   /* calificación para cada tipo */
    int          ins0, ins1;             /* penalizaciones por inserción */
    registro      id;                   /* índice diagonal */
    registro      ij;                   /* índice jmp */
    registro      *col0, *col1;          /* calificación para actual, última hilera */
    registro      xx, yy;               /* índice para seqs */

10    dx = (struct diag *)g_calloc("para obtener diags", len0+ len1+ 1, tamaño de(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("para obtener ndely", len1+ 1, tamaño de(int));
    dely = (int *)g_calloc("para obtener dely", len1+ 1, tamaño de(int));
    col0 = (int *)g_calloc("para obtener col0", len1+ 1, tamaño de(int));
    col1 = (int *)g_calloc("para obtener col1", len1+ 1, tamaño de(int));
    ins0 = (adn)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (adn)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
15    si (espacios terminales) {
        para (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++ ) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    de otro modo
        para (yy = 1; yy <= len1; yy++ )
            dely[yy] = -ins0;

    /* llenar en la matriz de coincidencia
    */
20    para (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++ , xx++ ) {
        /* inicializar la primera entrada en col
        */
        si (espacios terminales) {
            si (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ ins1);
            de otro modo
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        de otro modo {
25            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }

```

nw

Tabla 1 (cont')

...nw

```

para (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py+ + , yy+ + ) {
    mis = col0[yy-1];
    si (adn)
        mis + = (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    de otro modo
        mis + = _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* actualizar la penalización para del in x seq;
    * favorecer nuevo del sobre del continuo
    * ignorar MAXGAP si se ponderan espacios terminales
    */
    si (espacios terminales || ndely[yy] < MAXGAP) {
        si (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } de otro modo {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]+ + ;
        }
    } de otro modo {
        si (col0[yy] - (ins0+ ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } de otro modo
            ndely[yy]+ + ;
    }

    /* actualizar la penalización para del in y seq;
    * favorecer nuevo del sobre del continuo
    */
    si (espacios terminales || ndelx < MAXGAP) {
        si (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ ins1);
            ndelx = 1;
        } de otro modo {
            delx -= ins1;
            ndelx+ + ;
        }
    } de otro modo {
        si (col1[yy-1] - (ins0+ ins1) >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ ins1);
            ndelx = 1;
        } de otro modo
            ndelx+ + ;
    }

    /* tomar la clasificación máxima; se tiene a favor
    * mis sobre cualquier del y delx sobre dely
    */

```

Table 1 (cont')**...nw**

```

id = xx - yy + len1 - 1;
si (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
de otro modo si (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    si (dx[id].jp.n[0] && (!adn || (ndelx >= MAXJMP
&& xx > dx[id].jp.x[ij]+ MX) || mis > dx[id].clasificación+ DINS0)) {
        dx[id].ijmp+ + ;
        si (+ + ij >= MAXJMP) {
5            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].compensación = compensación;
            compensación += tamaño de(struct jmp) + tamaño de(compensación);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].clasificación = delx;
}
de otro modo {
10    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
si (dx[id].jp.n[0] && (!adn || (ndely[yy] >= MAXJMP
&& xx > dx[id].jp.x[ij]+ MX) || mis > dx[id].clasificación+ DINS0)) {
        dx[id].ijmp+ + ;
        si (+ + ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].compensación = compensación;
            compensación += tamaño de(struct jmp) + tamaño de(compensación);
        }
    }
15    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].clasificación = dely[yy];
}
si (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    si (espacios terminales)
        col1[yy] -= ins0+ ins1*(len1-yy);
    si (col1[yy] > smax) {
        smax = col1[yy];
        dmax = id;
20    }
}
}
si (espacios terminales && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+ ins1*(len0-xx);
si (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
25 (vacío) libre((car *)ndely);
(vacío) libre((car *)dely);
(vacío) libre((car *)col0);
(vacío) libre((car *)col1);
}

```

Tabla 1 (cont')

```

/*
*
* imprimir() --rutina solamente visible fuera de este módulo
*
* estático:
* obtenermat() -- rastrear mayor trayectoria, contra coincidencias: imprimir()
* pr_align() -- imprimir alineación descrita en configuración p[]: imprimir()
* bloque de descarga() -- descargar un bloque de líneas con números, estrellas: pr_align()
* nums() -- colocar un número de línea: bloque de descarga()
* poner línea -- colocar una línea (nombre, [num], seq, [num]): bloque de descarga()
* estrellas() - -poner una línea de estrellas: bloque de descarga()
5 * nombre de la cinta() --extender cualquier trayectoria y prefijar de un nombre de seq
*/

#include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LÍ NEA      256      /* línea máxima de salida */
#define P_SPC     3      /* espacio entre nombre o num y seq */

extern _día[26][26];
int olen;      /* fijar longitud de línea de salida */
10 ARCHIVO      *fx;      /* archivo de salida */

imprimir()
{
    int lx, ly, primer espacio, último espacio; /* traslape */

    si ((fx = fopen(oarchivo, "w")) == 0) {
        fimprimirf(stderr, "%s: no puede escribir %s\n", prog, oarchivo);
        limpieza(1);
    }
    fimprimirf(fx, "< first sequence: %s (longitud = %d)\n", nombre x[0], len0);
    fimprimirf(fx, "< segunda secuencia: %s (longitud = %d)\n", nombre x[1], len1);
15 olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    primer espacio = último espacio = 0;
    si (dmax < len1 - 1) { /* espacio guía in x */
        pp[0].spc = primer espacio = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    de otro modo si (dmax > len1 - 1) { /* espacio guía in y */
        pp[1].spc = primer espacio = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
20 }
    si (dmax0 < len0 - 1) { /* espacio de camino en x */
        último espacio = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= último espacio;
    }
    de otro modo si (dmax0 > len0 - 1) { /* espacio de camino en y */
        último espacio = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= último espacio;
    }
    obtenermat(lx, ly, primer espacio, último espacio);
    pr_align();
25 }

```

imprimir

Tabla 1 (cont')

```

/*
 * rastrear la mejor trayectoria, contar coincidencias
 */
estático
obtenermat(lx, ly, primer espacio, último espacio)
    int    lx, ly;                                /* "núcleo" (menos espacios terminales) */
    int    primer espacio, último espacio;        /* traslape de camino guí a */
{
    int          nm, i0, i1, siz0, siz1;
    car          outx[32];
5    doble       pct;
    registro     n0, n1;
    registro car *p0, *p1;

    /* tener coincidencias totales, clasificación
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

10    nm = 0;
    mientras ( *p0 && *p1 ) {
        si (siz0) {
            p1+ + ;
            n1+ + ;
            siz0--;
        }
        de otro modo si (siz1) {
            p0+ + ;
            n0+ + ;
            siz1--;
        }
15    de otro modo {
        si (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
            nm+ + ;
        si (n0+ + == pp[0].x[i0])
            siz0 = pp[0].n[i0+ + ];
        si (n1+ + == pp[1].x[i1])
            siz1 = pp[1].n[i1+ + ];
        p0+ + ;
        p1+ + ;
    }
    }
20 }

/* homología a pct:
 * si penaliza espacios terminales, la base es la seq más corta
 * de otro modo, descartar colgaduras y tomar el núcleo más corto
 */
si (espacios terminales)
    lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
de otro modo
    lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
    fimprimirf(fx, "\n");
    fimprimirf(fx, "< %d coincidencia%s en un traslape de %d: %.2f porcentaje de similitud\n",
25    nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

obtenermat

Tabla 1 (cont')

```
fimprimirf(fx, "< espacios en primera secuencia: %d", espaciox);
si (espaciox) {
    (vacío) simplimr(fx, " (%d %s%s)",
        nespaciox, (adn)? "base":"residuo", (nespaciox == 1)? "" : "s");
    fimprimirf(fx, "%s", outx);

    fimprimirf(fx, " ", espacios en segunda secuencia: %d", espacioy);
    si (espacioy) {
        (vacío) simplimr(fx, " (%d %s%s)",
            nespacioy, (adn)? "base":"residuo", (nespacioy == 1)? "" : "s");
        fimprimirf(fx, "%s", outx);
5    }
    si (adn)
        fimprimirf(fx,
            "\n< clasificación: %d (coincidencia = %d, no coincidencia = %d, penalización de espacio = %d + %d por
base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    de otro modo
        fimprimirf(fx,
            "\n< clasificación: %d (Dayhoff PAM 250 matriz, penalización de espacio = %d + %d por residuo)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    si (espacios terminales)
10        fimprimirf(fx,
            "< espacios terminales penalizados. espacio terminal izquierdo: %d %s%s, espacio terminal derecho: %d
%s%s\n",
            primer espacio, (adn)? "base" : "residuo", (primer espacio == 1)? "" : "s",
            último espacio, (adn)? "base" : "residuo", (último espacio == 1)? "" : "s");
    de otro modo
        fimprimirf(fx, "< espacios terminales no penalizados\n");
}

estático      nn;          /* coincidencias en núcleo -- para verificar */
estático      lmax;        /* longitudes de nombres de archivo extendidos */
estático      ij[2];       /* índice jmp para una trayectoria */
15 estático      nc[2];       /* número al inicio de la línea actual */
estático      ni[2];       /* número de elem actual -- para espaciamento */
estático      siz[2];
estático car  *ps[2];      /* ptr al elemento actual */
estático car  *po[2];      /* ptr a la siguiente salida casilla de car */
estático car  out[2][P_LÍ NEA]; /* línea de salida */
estático car  estrella[P_LÍ NEA]; /* fijo por estrellas() */

/*
* imprimir alineación de lo descrito en la trayectoria de estruct pp[]
*/
20 estático
pr_align()
{
    int          nn;          /* cuenta de car */
    int          más;
    registro     i;

    para (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = nombre de la cinta(nombre x[i]);
        si (nn > lmax)
            lmax = nn;

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

...obtenermat

pr_align

Tabla 1 (cont')

...pr_align

```

para (nn = nm = 0, más = 1; más; ) {
para (i = más = 0; i < 2; i+ + ) {
    /*
     * ¿ tenemos más de esta secuencia?
     */
    si (!*ps[i])
        continuar;

    más+ + ;

5    si (pp[i].spc) { /* espacio lí der */
        *po[i]+ + = ' ';
        pp[i].spc--;
    }
    de otro modo si (siz[i]) { /* en un espacio */
        *po[i]+ + = '-';
        siz[i]--;
    }
    de otro modo { /* ponemos un elemento de seq
        */
        *po[i] = *ps[i];
        si (es inferior (*ps[i]))
10         *ps[i] = al superior(*ps[i]);
        po[i]+ + ;
        ps[i]+ + ;

        /*
         * ¿ estamos en el siguiente espacio para esta seq?
         */
        si (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
            /*
             * se necesitan unir todos los espacios
             * en esta ubicación
             */
15         siz[i] = pp[i].n[ij[i]+ + ];
            mientras (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                siz[i] += pp[i].n[ij[i]+ + ];
        }
        ni[i]+ + ;
    }
}
si (+ + nm == olen || !más && nm) {
    bloque de descarga();
    para (i = 0; i < 2; i+ + )
        po[i] = out[i];
20    nn = 0;
}
}
}

/*
 * descargar un bloque de lí neas, incluyendo números, estrellas: pr_align()
 */
estático
bloque de descarga()
{
    registro i;
25    para (i = 0; i < 2; i+ + )
        *po[i]-- = '\0';

```

bloque de descarga

Tabla 1 (cont')

...bloque de descarga

```

(vací o) putc('\n', fx);
para (i = 0; i < 2; i+ + ) {
    si (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        si (i == 0)
            nums(i);
        si (i == 0 && *out[1])
            estrellas();
        colocar lí nea(i);
        si (i == 0 && *out[1])
            fimprimirf(fx, estrella);
        si (i == 1)
            nums(i);
    }
}

/*
 * colocar un número de lí nea: bloque de descarga()
 */
estático
10  nums(ix)                                nums
    int    ix;        /* índice en fuera[] mantener lí nea de seq */
    {
        car          nlí nea[P_LÍ NEA];
        registro      i, j;
        registro car   *pn, *px, *py;

        para (pn = nlí nea, i = 0; i < lmax+ P_SPC; i+ + , pn+ + )
            *pn = ' ';
        para (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py+ + , pn+ + ) {
            si (*py == ' ' || *py == '-')
                *pn = ' ';
            de otro modo {
                si (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                    j = (i < 0)? -i : i;
                    para (px = pn; j; j /= 10, px--)
                        *px = j%10 + '0';
                    si (i < 0)
                        *px = '-';
                }
                de otro modo
                    *pn = ' ';
                i+ + ;
            }
        }
        *pn = '\0';
        nc[ix] = i;
        para (pn = nlí nea; *pn; pn+ + )
            (vací o) poner c(*pn, fx);
        (vací o) poner c('\n', fx);
    }

/*
 * colocar una lí nea (nombre, [num], seq, [num]): bloque de descarga()
 */
25  estático
    colocar lí nea(ix)                                colocar lí nea
    int                                ix;            {

```

Tabla 1 (cont')

...colocar lí nea

```
int          i;
registro car  *px;

para (px = nombre x[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px+ + , i+ + )
    (vací o) poner c(*px, fx);
para (; i < lmax+ P_SPC; i+ + )
    (vací o) poner c(' ', fx);

/* estas cuentan desde1:
5  * ni[] es el elemento actual (desde1)
   * nc[] es el número al inicio de la lí nea actual
   */
para (px = out[ix]; *px; px+ + )
    (vací o) poner c(*px&0x7F, fx);
(vací o) poner c('\n', fx);
}

/*
10 * poner una lí nea de estrellas (seqs siempre en out[0], out[1]): bloque de descarga()
   */
estático
estrellas()
{
    int          i;
    registro car  *p0, *p1, cx, *px;

    si (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        regresar;
    px = estrella;
15  para (i = lmax+ P_SPC; i; i--)
        *px+ + = ' ';

    para (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0+ + , p1+ + ) {
        si (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
            cx = '*';
            nm+ + ;
        }
        de otro modo si (!adn && _dí a[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
            cx = '.';
20  de otro modo
            cx = ' ';

    }
    de otro modo
        cx = ' ';
    *px+ + = cx;
}
*px+ + = '\n';
*px = '\0';
}
```

estrellas

25

Tabla 1 (cont')

```
/*
 * trayectoria de cinta o prefijo de pn, regreso len: pr_alinear()
 */
estático
nombre de la cinta(pn)
    car    *pn;    /* nombre del archivo (puede ser trayectoria) */
{
    registro car    *px, *py;

    py = 0;
5    para (px = pn; *px; px++ )
        si (*px == '/')
            py = px + 1;
    si (py)
        (vacío) strcpy(pn, py);
    regresar(strlen(pn));
}
```

nombre de la cinta

10

15

20

25

Tabla 1 (cont')

```

/*
 * limpieza() -- limpieza de cualquier archivo tmp
 * obtener seq() -- leer en seq, fijar adn, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() con verif error
 * readjumps() -- obtener los buenos jumps, del archivo tmp si es necesario
 * writejumps() -- escribir una configuración llena de jumps a un archivo tmp: nw()
 */
#include "nw.h"
#include < sys/archivo.h>

5  car      *jname = "/tmp/homgXXXXXX";      /* archivo tmp para jumps */
   ARCHIVO      *fj;

   int      limpieza();                      /* limpieza tmp archivo */
   long      lseek();

/*
 * remover cualquier archivo tmp si parpadea
 */
limpieza(i)
10  int      i;
   {
   si (fj)
      (vacío) sin liga(jnombre);
      salir(i);
   }

/*
 * leer, regresar ptr a seq, fijar adn, len, maxlen
 * saltar líneas iniciando con ';', '<', o '>'
 * seq en mayúsculas o minúsculas
 */
15  car      *
   obtener seq(archivo, len)
      car      *archivo; /* nombre del archivo */
      int      *len;      /* seq len */
   {
      car      lí nea[1024], *pseq;
      registro car      *px, *py;
      int      natgc, tlen;
      ARCHIVO      *fp;

      si ((fp = fopen(archivo, "r")) == 0) {
         fimprimirf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, archivo);
         salir(1);
      }
      tlen = natgc = 0;
      mientras (fgets(lí nea, 1024, fp)) {
         si (*lí nea == ';' || *lí nea == '<' || *lí nea == '>')
            continuar;
         para (px = lí nea; *px != '\n'; px++)
            si (es superior(*px) || es inferior(*px))
               tlen++;
      }
      si ((pseq = malloc((sin identificar)(tlen+ 6))) == 0) {
         fimprimirf(stderr, "%s: malloc() falla en obtener %d bits para %s\n", prog, tlen+ 6, archivo);
         exit(1);
      }
      pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';

```

limpieza

obtener seq

Table 1 (cont')

...obtener seq

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

mientras (fgets(lí nea, 1024, fp)) {
    si (*lí nea == ';' || *lí nea == '<' || *lí nea == '> ')
        continue;
    para (px = lí nea; *px != '\n'; px++ ) {
        si (es superior(*px))
5          *py++ = *px;
        de otro modo si (es inferior(*px))
          *py++ = al superior(*px);
        si (í ndice("ATGCU", *(py-1)))
          natgc++ ;
    }
}
*py++ = '\0';
*py = '\0';
(vacío) fclose(fp);
adn = natgc > (tlen/3);
regresar(pseq+ 4);
10 }

car      *
g_calloc(msg, nx, sz)
    car    *msg;          /* programa, llamar rutina */
    int    nx, sz;        /* número y tamaño de los elementos */
{
    car      *px, *calloc();

    si ((px = calloc((sin identificar)nx, (sin identificar)sz)) == 0) {
15        si (*msg) {
            fimprimirf(stderr, "%s: g_calloc() falla %s (n= %d, sz= %d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    regresar(px);
}

/*
* obtener jmps finales de dx[] o archive tmp, fijar pp[], reiniciar dmax: principal()
*/

Leer jmps()
20 {
    int      fd = -1;
    int      siz, i0, i1;
    registro i, j, xx;

    si (fj) {
        (vacío) fclose(fj);
        si ((fd = abrir(jnombre, O_RDSOLAMENTE, 0)) < 0) {
            fimprimirf(stderr, "%s: no puede abrir() %s\n", prog, jnombre);
            limpieza(1);
        }
    }
}
25 para (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++ ) {
    mientras (1) {
        para (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
            ;
    }
}
```

g_calloc

leerjmps

Tabla 1 (cont')

...leerjumps

```

    si (j < 0 && dx[dmax].compensación && fj) {
        (vací o) lseek(fd, dx[dmax].compensación, 0);
        (vací o) read(fd, (car *)&dx[dmax].jp, tamaño de(struct jmp));
        (vací o) read(fd, (car *)&dx[dmax].compensación, tamaño de(dx[dmax].compensación));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    de otro modo
        romper;
}
5    si (i >= JMPS) {
        fimprimirf(stderr, "%s: demasiados espacios en alineación\n", prog);
        limpieza(1);
    }
    si (j >= 0) {
        siz = dx[dmax].jp.n[j];
        xx = dx[dmax].jp.x[j];
        dmax += siz;
        si (siz < 0) { /* espacio en segunda seq */
            pp[1].n[i1] = -siz;
            xx += siz;
            /* id = xx - yy + len1 - 1
            */
            pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
            espacioy+ + ;
            nespacioy -= siz;
/* ignorar MAXESPACIO cuando se hagan espacios terminales */
            siz = (-siz < MAXESPACIO || espacios terminales)? -siz : MAXESPACIO;
            i1+ + ;
        }
        de otro modo si (siz > 0) { /* espacio en primera seq */
            pp[0].n[i0] = siz;
            pp[0].x[i0] = xx;
            espaciox+ + ;
            nespaciox += siz;
15    /* ignorar MAXESPACIO cuando se hagan espacios terminales */
            siz = (siz < MAXESPACIO || espacios terminales)? siz : MAXESPACIO;
            i0+ + ;
        }
    }
    de otro modo
        romper;
}

/* inverter el orden de jumps
*/
20    para (j = 0, i0--; j < i0; j+ +, i0--) {
        i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
    }
    para (j = 0, i1--; j < i1; j+ +, i1--) {
        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
    }
    si (fd >= 0)
        (vací o) cerrar(fd);
25    si (fj) {
        (vací o) no ligar(jnombre);
        fj = 0;
        compensación = 0;
    }
}
```

Tabla 1 (cont')

```
/*
 * escribir una compensación de struct jmp llena del previo (si hay alguno): nw()
 */
Escribir jmps(ix)
    int    ix;
    {
        car    *mktemp();

5        si (!fj) {
            si (mktemp(jnombre) < 0) {
                fimprimirf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jnombre);
                limpieza(1);
            }
            si ((fj = fopen(jname, "w")) = 0) {
                fimprimirf(stderr, "%s: no puede escribir %s\n", prog, jnombre);
                exit(1);
            }
        }
        (vacío) fcribir((car *)&dx[ix].jp, tamaño de(struct jmp), 1, fj);
        (vacío) fcribir((car *)&dx[ix].compensación, tamaño de(dx[ix].compensación), 1, fj);
10    }
```

escribirjmps

15

20

25

Tabla 2

Proteína IL-17A/F XXXXXXXXXXXXXXXXX (Longitud = 15 aminoácidos)

5

Proteína de Comparación XXXXXXYYYYYYY (Longitud = 12 aminoácidos)

% identidad de secuencia de aminoácidos =

10

(el número de los residuos de aminoácidos idénticamente coincidentes entre las dos secuencias de polipéptidos como se determina por ALIGN-2) dividido entre (el número total de residuos de aminoácidos de la proteína IL-17A/F) =

15

5 dividido entre 15 = 33.3%

Tabla 3

Proteína IL-17A/F XXXXXXXXXXXX (Longitud =
10 aminoácidos)

5

Proteína de Comparación XXXXXYYYYYYZZYZ
(Longitud = 15 aminoácidos)

% identidad de secuencia de aminoácidos =

10

(el número de los residuos de aminoácidos idénticamente
coincidentes entre las dos secuencias de polipéptidos como se
determina por ALIGN-2) dividido entre (el número total de
residuos de aminoácidos de la proteína IL-17A/F) =

15

5 dividido entre 10 = 50%

Tabla 4

IL-17A/F-ADN NNNNNNNNNNNNNNNN (Longitud = 14
nucleótidos)

5

ADN de Comparación NNNNNNLLLLLLLLLLLLL
(Longitud = 16 nucleótidos)

% identidad de secuencia de ácidos nucleicos =

10

(el número de los nucleótidos idénticamente coincidentes
entre las dos secuencias de ácido nucleico como se determina
por ALIGN-2) dividido entre (el número total de nucleótidos
de la secuencia de ácido nucleico IL-17A/F-ADN) =

15

6 dividido entre 14 = 42.9%

Tabla 5

	IL-17A/F-ADN	NNNNNNNNNNNN	(Longitud = 12 nucleótidos)
5	ADN de Comparación	NNNNLLLVV	(Longitud = 9 nucleótidos)

% identidad de secuencia de ácidos nucleicos =

10 (el número de los nucleótidos idénticamente coincidentes
entre las dos secuencias de ácido nucleico como se determina
por ALIGN-2) dividido entre (el número total de nucleótidos
de la secuencia de ácido nucleico IL-17A/F-ADN) =

15 4 dividido entre 12 = 33.3%

II. Composiciones y Métodos de la Invención

A. Polipéptidos IL-17A/F de Longitud Completa

La presente invención proporciona secuencias de nucleótidos recientemente identificadas y aisladas que
5 codifican polipéptidos referidos en la presente solicitud como polipéptidos IL-17A/F. En particular, los cADN que codifican varios polipéptidos IL-17A/F se han identificado y aislado, como se describe en mayor detalle en los Ejemplos abajo.

10 B. Variantes de Polipéptido IL-17A/F

Además del polipéptidos IL-17A/F de secuencia nativa de longitud completa descritos en la presente, se contempla que las variantes IL-17A/F pueden prepararse. Las variantes IL-17A/F pueden prepararse al introducir cambio de nucleótido
15 apropiados en el ADN de IL-17A/F, y/o por síntesis del polipéptido IL-17A/F deseado. Aquellos de habilidad en el arte apreciarán que los cambios de aminoácido pueden alterar los procesos post-traduccion del IL-17A/F, tales como cambiar el número o posición de sitios de glicosilación o alterar las
20 características de anclado de membrana.

Las variaciones en la secuencia IL-17A/F de longitud completa nativa o en varios dominios de IL-17A/F descrito en la presente, pueden hacerse, por ejemplo, usando cualesquiera de las técnicas y guías para mutaciones conservadas y no
25 conservadas establecidas, por ejemplo, en la Patente E.U.A.

No. 5,364,934. Las variaciones pueden ser una substitución, eliminación o inserción de uno o más codones que codifican IL-17A/F que resulta en un cambio en la secuencia de aminoácido del IL-17A/F en comparación con la secuencia IL-17A/F nativa. Opcionalmente la variación es por la substitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del IL-17A/F. La guía para determinar que residuos de aminoácido puede insertarse, substituirse o eliminarse sin afectar adversamente la actividad deseada puede encontrarse al comparar la secuencia del IL-17A/F con la de las moléculas de proteína conocidas homólogas y minimizar el número de cambios de secuencia de aminoácido hechos en regiones de alta homología. Las substituciones de aminoácido pueden ser el resultado de reemplazar un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como el reemplazo de una leucina con una serina, esto es, reemplazos de aminoácido conservadores. Las inserciones o eliminaciones puede opcionalmente estar en el rango de alrededor de 1 hasta 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse por inserciones, eliminaciones o substituciones hechas sistémicamente, de aminoácido en la secuencia y probar las variantes resultantes para actividad

exhibida por la secuencia nativa madura o de longitud completa.

Los fragmentos de polipéptido IL-17A/F se proporcionan en la presente. Tales fragmentos pueden truncarse en la terminal N o terminal C, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se compara con proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de residuos de aminoácido que no son esenciales para la actividad biológica deseada del polipéptido IL-17A/F.

Los fragmentos IL-17A/F pueden prepararse por cualesquiera de un número de técnicas convencionales. Los fragmentos péptido deseado pueden sintetizarse químicamente. Un enfoque alternativo involucra generar fragmentos IL-17A/F por digestión enzimática, por ejemplo, al tratar la proteína con una enzima conocida para desdoblar proteínas en sitios definidos por residuos de aminoácido particulares, o al digerir el AND con enzimas de restricción apropiadas y aislar el fragmento deseado. Aún otra técnica apropiada involucra aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica el fragmento de polipéptido deseado, por reacción de cadena de polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen la terminación deseada del fragmento de ADN se emplean en los cebadores 5' y 3' en el PCR. Preferiblemente, los fragmentos de polipéptido IL-17A/F portan al menos una actividad

biológica e/o inmunológica con el polipéptido IL-17A/F nativo descrito en la presente.

En realizaciones particulares, las substituciones conservadoras de interés se muestran en la Tabla 6 bajo el encabezado de substituciones preferidas. Si tales substituciones resultan en un cambio en la actividad biológica, entonces más cambios substanciales, denominados substituciones ejemplares en la Tabla 6, o como se describe además abajo con referencia a las clases de aminoácido, se introducen y los productos se seleccionan.

Tabla 6

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

Las modificaciones substanciales en función o identidad inmunológica del polipéptido IL-17A/F se realizan al seleccionar substituciones que difieren significativamente en sus efectos en mantener (a) la estructura de la columna del polipéptido en el área de la substitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos que se presentan naturalmente se dividen en grupos con base en las propiedades de cadena lateral comunes:

- (1) hidrofóbicas: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílica neutral: cys, ser, thr;
- (3) ácida: asp, glu;
- (4) básica: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residuos que tienen influencia en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromático: trp, tyr, phe.

Las substituciones no conservadoras ocasionan intercambio en miembros de una de estas clases para otra clase. Tales residuos substituidos también pueden introducirse en los sitios de substitución conservadores o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

Las variaciones pueden hacerse usando métodos conocidos en el arte tal como mutagénesis mediada por olinucleótido

(dirigida al sitio), barrido de alanina, y mutagénesis PCR. La mutagénesis dirigida al sitio [Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], mutagénesis de casete (Wells *et al.*, Gene, 5 34:315 [1985]), mutagénesis de selección por restricción (Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 [1986]) u otras técnicas conocidas pueden realizarse en el ADN clonado para producir el ADN variante IL-17A/F.

El análisis de barrido de aminoácido se puede emplear 10 para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos barridos preferidos están los aminoácidos neutrales, relativamente pequeños. Tales aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina, y cisteína. La alanina es un aminoácido barrido típicamente 15 preferido entre este grupo debido a que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de cadena principal de la variante (Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085 [1989]). La alanina también se prefiere típicamente debido a que es el 20 aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente en posiciones tanto enterrada como expuesta (Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 [1976]). Si la substitución de alanina no proporciona cantidades adecuadas de variante, puede usarse un aminoácido 25 isotérico.

C. Modificaciones de IL-17A/F

Las modificaciones covalentes de IL-17A/F se incluyen dentro del alcance de esta invención. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar residuos de aminoácido
5 objetivo de un polipéptido IL-17A/F con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos de termina N o C del IL-17A/F. La derivación con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular IL-17A/F hasta una matriz o
10 superficie de soporte insoluble en agua para usar en el método para purificar anticuerpos anti-IL-17A/F, y al contrario. Los agentes reticulantes comúnmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo,
15 ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

20 Otras modificaciones incluyen desaminación de residuos de glutaminilo y asparaginilo a los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos α -
25 amino de cadenas laterales de lisina, arginina, e histidina

[T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], la acetilación de la amina de terminal N, y la amidación de cualquier grupo carboxilo de termina C.

5 Otro tipo de modificación covalente del polipéptido IL-17A/F incluida dentro del alcance de esta invención comprende alterar el patrón de glicosilación nativo del polipéptido. "Alterar el patrón de glicosilación nativo" se pretende para propósitos en la presente que signifique una o más porciones
10 de carbohidrato encontradas en la secuencia nativa IL-17A/F (ya sea al remover el sitio de glicosilación fundamental o al eliminar la glicosilación por medios químicos /o enzimáticos), y/o agregar uno o más sitios de glicosilación que no se presentan en la secuencia nativa IL-17A/F. Además,
15 la frase incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, que involucren un cambio en la naturaleza y proporciones de las diferentes porciones de carbohidratos presentes.

La adición de los sitios de glicosilación para el IL-
20 17A/F el polipéptido puede realizarse al alterar la secuencia de aminoácido. La alteración puede hacerse, por ejemplo, por la adición de, o substitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia nativa IL-17A/F (para sitios de glicosilación ligados a O). La secuencia de aminoácido IL-
25 17A/F puede opcionalmente alterarse a través de los cambios

en el nivel de ADN, particularmente al mutar el ADN que codifica el polipéptido IL-17A/F en bases preseleccionadas de tal manera que los codones se generan que se traduzcan en los aminoácidos deseados.

5 Otros medios para incrementar el número de porciones de carbohidratos en el polipéptido IL-17A/F es por acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Tales métodos se describen en el arte, por ejemplo, en WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987 y en Aplin and Wriston,
10 CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).

La remoción de las porciones de carbohidratos presentes en el polipéptido IL-17A/F puede realizarse químicamente o enzimáticamente o por substitución mutacional de los codones que codifican para residuos de aminoácidos que sirven como
15 objetivos para glicosilación. Las técnicas de desglicosilación química se conocen en el arte y se describen, por ejemplo, por Hakimuddin, *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) y por Edge *et al.*, Anal. Biochem., 118:131 (1981). El desdoblamiento enzimático de
20 porciones de carbohidratos en polipéptidos puede alcanzarse por el uso de una variedad de endo- y exo-glicosilasas como se describe por Thotakura *et al.*, Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de IL-17A/F
25 comprende ligar el polipéptido IL-17A/F a uno de una variedad

de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilen glicol (PEG), polipropilen glicol, o polioxialquilenos, en la manera establecida en las patentes de E.U.A. Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 o 4,179,337.

5 El IL-17A/F de la presente invención también puede modificarse de manera que forma una molécula quimérica que comprende IL-17A/F fusionado a otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos.

En una realización, tal molécula quimérica comprende una
10 fusión del IL-17A/F con un polipéptido de etiqueta que proporciona un epítipo al cual un anticuerpo etiqueta puede enlazarse selectivamente. La etiqueta epítipo se coloca generalmente en la terminal amino o carboxilo del IL-17A/F. La presencia de tales formas etiquetadas con epítipo del IL-
15 17A/F pueden eliminarse usando un anticuerpo contra el polipéptido de etiqueta. También, la condición de la etiqueta de epítipo permite que el IL-17A/F se purifique rápidamente por purificación por afinidad usando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que enlaza a la
20 etiqueta epítipo. Varios polipéptidos de etiqueta y sus respectivos anticuerpos son bien conocidos en el arte. Los ejemplos incluyen etiquetas poly-histidina (poly-his) o poly-histidina-glicina (poly-his-gly); el polipéptido de etiqueta flu HA y su anticuerpo 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol.,
25 8:2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9,

3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de esto [Evan *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de glicoproteína D del virus del herpes simplex (gD) y su anticuerpo [Paborsky *et al.*, *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos de etiqueta incluyen el péptido Flag [Hopp *et al.*, *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]; el péptido de epítipo KT3 [Martin *et al.*, *Science*, 255:192-194 (1992)]; un péptido de epítipo de α -tubulina [Skinner *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]; y la etiqueta de péptido 10 del gen T7 [Lutz-Freyermuth *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)].

En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del IL-17A/F con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también referida como una "inmunoadhesina"), tal fusión será a la región Fc de una molécula IgG. Las fusiones Ig incluyen preferiblemente la substitución de una forma soluble (dominio de transmembrana eliminado o inactivado) de un polipéptido IL-17A/F en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye la articulación, CH2 y CH3, o las regiones de articulación, CH1, CH2 y CH3 de una molécula IgG1. Para la

producción de fusiones de inmunoglobulina ver también la Patente E.U.A. No. 5,428,130 publicada el 27 de junio 1995.

Aún en una realización adicional, los polipéptidos IL-17A/F de la presente invención también pueden modificarse de manera que formen una molécula quimérica que comprende un polipéptido IL-17A/F fusionado a una cremallera de leucina. Varios polipéptidos de cremallera de leucina se han descrito en el arte. Ver, por ejemplo, Landschulz *et al.*, Science, 240:1759 (1988); WO 94/10308; Hoppe *et al.*, FEBS Letters, 344:1991 (1994); Maniatis *et al.*, Nature, 341:24 (1989). Se considera que el uso de una cremallera de leucina fusionada a un polipéptido IL-17A/F puede ser deseable para asistir en dimerizar o trimerizar el polipéptido IL-17A/F soluble en solución. Aquellos expertos en la técnica apreciarán que la cremallera de leucina puede fusionarse en cualquier extremo de termina N o C de la molécula IL-17A/F.

D. Preparación de IL-17A/F

La descripción enseguida se refiere primariamente a la producción de IL-17A/F al cultivar células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico IL-17A/F. Por supuesto, se contempla que métodos alternativos, que son bien conocidos en el arte, pueden emplearse para preparar IL-17A/F. Por ejemplo, la secuencia IL-17A/F, o porciones de la misma, puede producirse por síntesis de

péptido directa usando técnicas de fase sólida [ver, por ejemplo, Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteína in vitro puede realizarse usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automática puede realizarse, por ejemplo, usando un Sintetizador Péptido de Applied Biosystems (Foster City, CA) usando las instrucciones del fabricante. Varias porciones del IL-17A/F pueden sintetizarse químicamente de forma separada y se combina usando métodos químicos o enzimáticos para producir el IL-17A/F de longitud completa.

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

El ADN que codifica IL-17A/F puede obtenerse de una colección de cADN preparado de tejidos considerados para procesar el mRNA IL-17A/F y para expresar en un nivel detectable. En consecuencia, el ADN de IL-17A/F puede obtenerse convenientemente de una colección de cADN preparada de tejido humano, tal como se describe en los Ejemplos. El gen que codifica IL-17A/F puede también obtenerse de una colección genómica o por procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis de ácido nucleico automática).

Las colecciones pueden separarse por exclusión con sondas (tal como anticuerpos al IL-17A/F u oligonucleótidos

de al menos alrededor de 20-80 bases) diseñados para identificar el gen de interés o la proteína codificada por este. La separación por exclusión del cADN o colección genómica con la sonda seleccionada puede conducirse usando
5 procedimientos estándar, tal como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica IL-17A/F es usar metodología PCR [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer:
10 A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Los ejemplos abajo describen técnicas para separar por exclusión una colección de cADN. Las secuencias de oligonucleótido seleccionadas como sondas deberán ser de
15 longitud suficiente y suficientemente no ambiguas de manera que los positivos falsos se minimicen. El oligonucleótido se etiqueta preferiblemente de tal manera que puede detectarse durante la hibridización al ADN en la colección a separarse por exclusión. Los métodos de etiquetado son bien conocidos
20 en el arte, e incluyen el uso de radioetiquetas tipo ATP etiquetado con ^{32}P , biotinilación o etiquetado de enzima. Las condiciones de hibridización, incluyen severidad moderada y severidad alta, se proporcionan en Sambrook *et al.*, *supra*.

Las secuencias identificadas en tales métodos de
25 separación por exclusión de colección pueden compararse y

alinearse a otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank u otras bases de datos de secuencias privadas. La identidad de secuencia (en cualquier nivel de aminoácido o nucleótido) dentro de regiones definidas de la molécula o a través de la secuencia de longitud completa puede determinarse usando métodos conocidos en el arte y como se describe en la presente.

La secuencia que codifica la proteína que tiene ácido nucleico puede obtenerse por separar por exclusión cADN o colecciones genómicas usando la secuencia de aminoácido deducida descrita en la presente para la primera vez, y, si es necesario, usando procedimientos de extensión de cebador convencionales como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, para detectar precursores e intermediarios de procesamiento de mRNA que pueden no ser de transcripción inversa en el cADN.

2. Selección y Transformación de Células Hospederas

Las células hospederas se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en la presente para la producción y cultivo de IL-17A/F en medio nutriente convencional como sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que

codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medio, temperatura, pH y similares, pueden seleccionarse por el técnico experto sin experimentación indebida. En general, los principios, 5 protocolos, y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares puede encontrarse en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, *supra*.

Los métodos de transfección de células eucarióticas y 10 transformación de células procarióticas se conocen por el técnico ordinariamente experto, por ejemplo, CaCl_2 , CaPO_4 , mediada por liposoma y electroporación. Dependiendo de la célula hospedera usada, la transformación se realiza usando técnicas estándar apropiadas para tales células. El 15 tratamiento de calcio emplea cloruro de calcio, como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, o la electroporación se usa generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células de planta, como se describe por Shaw *et al.*, 20 Gene, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio 1989. Para células de mamíferos sin tales paredes de célula, el método de precipitación de fosfato de calcio de Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978) puede emplearse. Los aspectos generales de las transfecciones del sistema de 25 célula hospedera de mamífero se han descrito en la patente de

E.U.A. No. 4,399,216. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo típicamente de acuerdo al método de Van Solingen et al., J. Bact., 130:946 (1977) y Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). Sin embargo, 5 otros métodos para introducir ADN en las células, tal como por microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacterial con células intactas, o policiones, por ejemplo, polibreno, poliornitina, también pueden usarse. Para varias técnicas de transformación de células de 10 mamífero, ver Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) y Mansour et al., Nature, 336:348-352 (1988).

Las células hospederas apropiadas para clonar o expresar el ADN en vectores en la presente incluyen células procariotas, de levadura o eucarióticas superiores. Las 15 procariotas apropiadas incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceas tales como *E. coli*. Varias cepas de *E. coli* están disponibles publicamente, tales como *E. coli* K12 cepa MM294 (ATCC 20 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli* cepa W3110 (ATCC 27,325) y K5 772 (ATCC 53,635). Otras células hospederas procarióticas incluyen Enterobacteriaceas tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, 25 *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia*

marcescans, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266,710 publicado el 12 de Abril 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos
5 ejemplos son ilustrativos en vez de limitantes. La cepa W3110 es un hospedero particularmente preferido u hospedero precursor debido a que es una cepa hospedera común para fermentaciones de ducto IL-17A/F recombinante. Preferiblemente, la célula hospedera secreta cantidades
10 mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para efectuar la mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al hospedero, con ejemplo de tales hospederos incluyendo *E. coli* W3110 cepa 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; *E. coli* W3110 cepa
15 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 cepa 27C7 (ATCC 55,244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^r*; *E. coli* W3110 cepa 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; *E. coli* W3110 cepa
20 40B4, que es la cepa 37D6 con una mutación de eliminación *degP* no resistente a la canamicina; y una cepa *E. coli* que tiene la proteasa periplásmica mutante descrita en la patente de E.U.A. No. 4,946,783 publicada el 7 de agosto 1990. Alternativamente, los métodos *in vitro* de clonación, por

ejemplo, PCR u otras reacciones de polimerasa de ácido nucleico, son apropiados.

Además de las procariotas, los microbios eucarióticos, tales como hongos filamentosos o levadura son hospederos de clonación o expresión apropiados para vectores que codifican IL-17A/F. La *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedero eucariótico comúnmente usado. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* [Beach and Nurse, Nature, 290: 140 (1981); EP 139,383 publicada el 2 de mayo 1985]; hospederos *Kluyveromyces* (Patente E.U.A. No. 4,943,529; Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 [1991]) tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., J. Bacteriol., 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135 [1990]), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394,538 publicada el 31 de octubre 1990); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 publicada el 10 de enero 1991), y hospederos *Aspergillus*

tales como *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn et al., Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Las levaduras metilotrópicas son apropiadas en la presente e incluyen, pero no se limitan a, levaduras capaces de crecer en metanol que consiste de *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. C. Anthony, The Biochemistry of Methylootrophs, 269 (1982).

Las células hospederas para la expresión de IL-17A/F glicosilado se derivan de organismo multicelulares. Los ejemplos de células invertebradas incluyen células de insecto tales como células *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9 o *Spodoptera* 5 superior, así como células de plantas. Los ejemplos de líneas de células hospederas de mamífero útiles incluyen células de ovarios de hámster chino (CHO) y células COS. Los ejemplos más específicos incluyen línea CV1 de riñón de mono transformado por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecer en cultivo de suspensión, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de ovarios de hámster chinos/-DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 [1980]); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 [1980]); células de pulmón humano

(W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). La selección de la célula hospedera apropiada se aprecia para estar dentro de la habilidad en el arte.

5

3. Selección y Uso de un Vector Replicable

El ácido nucleico (por ejemplo, cADN o ADN genómico) que codifica IL-17A/F puede insertarse en un vector replicable para clonación (amplificación del ADN) o para expresión. 10 Varios vectores están disponibles públicamente. El vector puede, por ejemplo, estar en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral, o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector por una variedad de procedimiento. En general, el ADN se inserta en sitios de 15 endonucleasa de restricción apropiada usando técnicas conocidas en el arte. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, una o más de una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento aumentador, un promotor, y una secuencia de 20 terminación de transcripción. La construcción de vectores apropiadas contiene uno o más de estos componentes empleando técnicas de ligación estándar que se conocen para el técnico experto.

El IL-17A/F puede producirse recombinantemente no sólo 25 directamente, pero también como un polipéptido de fusión con

un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia de señal u otro polipéptido que tiene un sitio de desdoblamiento específico en la terminal N de la proteína madura o polipéptido. En general, la secuencia de señal puede ser un
5 componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica IL-17A/F que se inserta en el vector. La secuencia de señal puede ser una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilina, lpp, o líderes de enterotoxina II
10 estables al calor. Para secreción de levadura la secuencia de señal puede ser, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, líder de factor alfa (incluyendo líderes del factor α *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, el último descrito en la patente de E.U.A. No. 5,010,182), o líder de fosfatasa ácida,
15 el líder de glucoamilasa *C. albicans* (EP 362,179 publicada el 4 Abril 1990), o la señal descrita en WO 90/13646 publicada el 15 Noviembre 1990. En la expresión de células de mamífero, las secuencias de señal de mamífero pueden usarse para dirigir la secreción de la proteína, tal como secuencias de
20 señal de polipéptidos secretados de la misma o especies relacionadas, así como líderes secretores virales.

Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicar en una o más células hospederas seleccionadas. Tales secuencias
25 son bien conocidas para una variedad de bacterias, levadura,

y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es apropiado para la mayoría de las bacterias Gram negativas, el origen del plásmido 2 μ es apropiado para levadura, y varios orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son
5 útiles para clonar vectores en células de mamífero.

Los vectores de clonación y expresión contienen típicamente un gen de selección, también llamado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u
10 otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxitróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio de complejo, por ejemplo, el gen que codifica la racemasa D-alanina para *Bacilli*.

15 Un ejemplo de marcadores seleccionables apropiados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para tomar el ácido nucleico que codifica IL-17A/F, tal como DHFR o timidina cinasa. Una célula hospedera apropiada cuando se emplea DHFR
20 de tipo silvestre es la línea de célula CHO deficiente en actividad DHFR, preparada y propagada como se describe por Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección apropiado para usarse en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido YRp7 de levadura
25 [Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al.,

Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10:157 (1980)].
El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una
cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para
crecer en triptofano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1
5 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

Los vectores de expresión y clonación contienen
usualmente un promotor ligado operablemente a la secuencia de
ácido nucleico que codifican IL-17A/F para síntesis de mRNA
directa. Los promotores reconocidos por una variedad de
10 células hospederas potenciales son bien conocidos. Los
promotores apropiados para usarse con hospederos
procarióticos incluyen la β -lactamasa y sistemas promotores
de lactosa [Chang *et al.*, Nature, 275:615 (1978); Goeddel *et*
al., Nature, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema
15 promotor de triptofano (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res.,
8:4057 (1980); EP 36,776], y promotores híbridos tales como
el promotor *tac* [deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
80:21-25 (1983)]. Los promotores para usarse en sistemas
bacteriales contienen también una secuencia Shine-Dalgarno
20 (S.D.) ligada operablemente al ADN que codifica IL-17A/F.

Ejemplos de secuencias promotoras apropiadas para usarse
con hospedadores de levadura incluyen los promotores para la
3-fosfoglicerato cinasa [Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem.,
255:2073 (1980)] u otras enzimas glicolíticas [Hess *et al.*,
25 J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry,

17:4900 (1978)], tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucocinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por condiciones de crecimiento, son las regiones de promotor para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo de nitrógeno, metalotioneina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables para utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores apropiados para usarse en la expresión de levadura se describen además en EP 73,657.

La transcripción IL-17A/F de vectores en células hospederas de mamífero se controla, por ejemplo, por promotores que se obtienen de los genomas de virus tales como el virus de polio, virus de viruela de aves (UK 2,211,504 publicada el 5 Julio 1989), adenovirus (tales como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus de sarcoma de aves, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis B y virus de simio 40 (SV40), a partir de promotores mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque de calor, con

la condición de que tales promotores sean compatibles con los sistemas de célula hospedera.

La transcripción del ADN que codifica el IL-17A/F por eucariotas superiores puede incrementarse al insertar una
5 secuencia aumentadora en el vector. Los aumentadores son elementos que actúan en cis de ADN, usualmente de alrededor de 10 a 300 bp, que actúan en el promotor para incrementar su transcripción. Muchas secuencias aumentadoras se conocen ahora de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -
10 fetoproteína, e insulina). Típicamente, sin embargo, se usa un aumentador de un virus de célula eucariótica. Los ejemplos incluyen el aumentador SV40 en el lado tardío del origen de replicación (bp 100-270), el aumentador del promotor temprano de citomegalovirus, el aumentador de polio en el lado
15 tardío del origen de replicación, y aumentadores de adenovirus. El aumentador puede empalmarse en el vector en la posición 5' o 3' a la secuencia de codificación IL-17A/F, pero preferiblemente se localiza en el sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión usados en células hospederas
20 eucarióticas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismo multicelulares) también contienen secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el mRNA. Tales secuencias están disponibles comúnmente de las
25 regiones no traducidas 5' y ocasionalmente 3', de ADN y cADN

virales o eucarióticos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótido transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del mRNA que codifica IL-17A/F.

Todavía otros métodos, vectores, y células hospederas
5 apropiadas para la adaptación a la síntesis de IL-17A/F en cultivo de célula vertebrada recombinante se describen en Gething *et al.*, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117,060; y EP 117,058.

4. Amplificación/Expresión del Gen Detectado

10 La amplificación y/o expresión de genes puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo, por inmunotransferencia Southern convencional, inmunotransferencia Northern para cuantificar la transcripción del mRNA (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA,
15 77:5201-5205 [1980]), inmunotransferencia de punto (análisis de ADN), o hibridización *in situ*, usando una sonda apropiadamente etiquetada, con base en las secuencias proporcionadas en la presente. Alternativamente, los anticuerpos pueden emplearse de manera que pueden reconocer
20 los dúplex específicos, incluyendo los dúplex de ADN, dúplex de ARN, y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de proteína de ADN. Los anticuerpos de nuevo pueden etiquetarse y el ensayo puede llevarse a cabo donde el dúplex se enlaza a la superficie, de manera que durante la formación del dúplex en

la superficie, la presencia del anticuerpo enlazado al dúplex puede detectarse.

La expresión del gen, alternativamente, puede medirse por métodos inmunológicos, tales como teñido
5 inmunohistoquímico de células o secciones de tejido y ensayo de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto de gen. Los anticuerpos útiles para el teñido inmunohistoquímico y/o ensayo de fluidos muestra puede ser ya sea monoclonal o
10 policlonal, y puede prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido de secuencia nativa IL-17A/F o contra un péptido sintético con base en la secuencia de ADN proporcionada en la presente o contra la secuencia exógena fusionada al ADN de
15 IL-17A/F y que codifica un epítipo de anticuerpo específico.

5. Purificación del Polipéptido

Las formas de IL-17A/F pueden recuperarse del medio de cultivo o de los lisados de célula hospedera. Si se enlazan a la membrana, pueden liberarse de la membrana usando una
20 solución detergente apropiada (por ejemplo, Triton-X 100) o por desdoblamiento enzimático. Las células empleadas en la expresión de IL-17A/F pueden romperse por varios medios físicos o químicos, tales como ciclo congelado-descongelado, sonicación, disrupción mecánica, o agentes de lisado celular.

Puede desearse purificar IL-17A/F de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplares de procedimientos de purificación apropiados: por fraccionamiento en una columna de intercambio de iones; precipitación de etanol; CLAR de fase inversa; cromatografía en sílice o en resina de intercambio de cationes como DEAE; enfoque cromatográfico; SDS-PAGE; precipitación de sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A Sepharose para remover los contaminantes tales como IgG; y columnas quelantes de metal para enlazar las formas etiquetadas al epítipo del IL-17A/F. Varios métodos de purificación de proteína pueden emplearse y tales métodos se conocen en el arte y se describen por ejemplo en Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982). Las etapas de purificación seleccionadas dependen, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción y el IL-17A/F particular producido.

20 E. Usos para IL-17A/F

Las secuencias de nucleótidos (o sus complementos) que codifican IL-17A/F tienen varias aplicaciones en el arte de la biología molecular, incluyendo usos como sondas de hibridización, en cromosoma y mapeo de genes y en la

generación de ARN y ADN antisentido. El ácido nucleico IL-17A/F también puede ser útil para la preparación de polipéptidos IL-17A/F por técnicas recombinantes descritas en la presente.

5 El gen de secuencia nativa de longitud completa IL-17A/F, o porciones del mismo, pueden usarse como sondas de hibridización para la colección de cADN para aislar el cADN IL-17A/F de longitud completa o para aislar todavía otros cADN (por ejemplo, aquellas variantes que se presentan
10 naturalmente de IL-17A/F o IL-17A/F de otras especies) que tienen la identidad de secuencia deseada a la secuencia IL-17A/F nativa descrita en la presente. Opcionalmente, la longitud de las sondas será de alrededor de 20 a alrededor de 50 bases. Las sondas de hibridización pueden administrarse
15 desde al menos regiones parcialmente nuevas de la secuencia de nucleótido de longitud completa nativa en donde aquellas regiones pueden determinarse sin experimentación indebida o a partir de secuencias genómicas que incluyen promotores, elementos aumentadores e intrones de secuencia nativa IL-
20 17A/F. A modo de ejemplo, un método de separación por exclusión comprende aislar la región de codificación del gen IL-17A/F usando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de alrededor de 40 bases. Las sondas de hibridización pueden etiquetarse por una variedad de
25 etiquetas, incluyendo radionúclidos tales como ^{32}P o ^{35}S , o

etiquetas enzimáticas tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda por medio de sistemas de acoplamiento de avidina/biotina. Las sondas etiquetadas tienen una secuencia complementaria a la del gen IL-17A/F de la presente invención
5 pueden usarse para separar por exclusión colección de cADN humano, ADN o mRNA genómico para determinar que miembros de tales colección la sonda hibridiza. Las técnicas de hibridización se describen en mayor detalle en los ejemplos de abajo.

10 Cualesquiera de las secuencias EST descritas en la presente solicitud pueden emplearse similarmente como sondas, usando los métodos descritos en la presente.

Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos IL-17A/F incluyen oligonucleótidos antisentido o sentido que
15 comprenden una secuencia de ácido nucleico de hebra sencilla (ya sea ARN o ADN) capaz de enlazarse al mRNA IL-17A/F objetivo (sentido) o secuencias ADN IL-17A/F (antisentido). Los oligonucleótidos antisentido o sentido, de acuerdo con la presente invención, comprenden un fragmento de la región de
20 codificación de ADN IL-17A/F. Tal fragmento comprende generalmente al menos alrededor de 14 nucleótidos, preferiblemente desde alrededor de 14 a 30 nucleótidos. La capacidad para derivar un oligonucleótido antisentido o sentido, con base en una secuencia de cADN que codifica una
25 proteína dada se describe en, por ejemplo, Stein and Cohen

(Cancer Res. 48:2659, [1988]) y van der Krol *et al.* (BioTechniques, 6:958, [1988]).

El enlace de los oligonucleótidos antisentido o sentido para secuencias de ácido nucleico objetivo resulta en la
5 formación de dúplex que bloquean la transcripción o traducción de la secuencia objetivo por uno de varios medios, incluyendo la degradación aumentada de los dúplex, la terminación prematura de transcripción o traducción, o por otros medios. Los oligonucleótidos antisentido de esta manera
10 pueden usarse para bloquear la expresión de las proteínas IL-17A/F. Los oligonucleótidos antisentido o sentido comprenden además oligonucleótidos que modifican columnas de azúcar-fosfodiéster modificadas (u otras ligaduras de azúcar, tales como aquellas descritas en WO 91/06629) y en donde tales
15 ligaduras de azúcar son resistentes a las nucleasas endógenas. Tales oligonucleótidos con ligaduras de azúcar resistentes son estables *in vivo* (esto es, capaces de resistir la degradación enzimática) pero mantienen la especificidad de secuencia para ser capaces de enlazarse a
20 secuencias de nucleótido objetivo.

Otros ejemplos de oligonucleótidos sentido o antisentido incluyen aquellos oligonucleótidos que se ligan covalentemente a porciones orgánicas, tales como aquellas descritas en WO 90/10048, y otras porciones que incrementan
25 la afinidad del oligonucleótido para una secuencia de ácido

nucleico objetivo, tal como poli-(L-lisina). Todavía además, los agentes de intercalado, tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos de metal pueden enlazarse a oligonucleótidos sentido o antisentido para modificar
5 especificidades de enlace del oligonucleótido antisentido o sentido para la secuencia de nucleótido objetivo.

Los oligonucleótidos antisentido o sentido pueden introducirse en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico objetivo por cualquier método de transferencia de
10 genes, incluyendo, por ejemplo, transfección de ADN mediada por CaPO_4 , electroporación, o por el uso de vectores de transferencia de genes tales como virus Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, un oligonucleótido antisentido o sentido se inserta en un vector retroviral apropiado. Una
15 célula que contienen la secuencia de ácido nucleico objetivo se pone en contacto con el vector retroviral recombinante, ya sea in vivo o ex vivo. Los vectores retrovirales apropiados incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados de retrovirus de murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV), o los vectores de copia doble designados DCT5A, DCT5B
20 y DCT5C (WO 90/13641).

Los oligonucleótidos sentido o antisentido también pueden introducirse en una célula que contiene la secuencia de nucleótido objetivo por formación de un conjugado con una
25 molécula enlazada al ligando, como se describe en WO

91/04753. Las moléculas enlazadas al ligando incluyen, pero no se limitan a, receptores de superficie celular, factores de crecimiento, otras citoquinas, u otros ligandos que enlazan a los receptores de superficie celular.

5 Preferiblemente, la conjugación de la molécula de enlace del ligando no interfiere substancialmente con la capacidad de la molécula enlazada al ligando para enlazarse a la molécula o receptor correspondiente, o bloquea la entrada del oligonucleótido sentido o antisentido o su versión conjugada

10 en la célula.

Alternativamente, el oligonucleótido sentido o antisentido puede introducirse en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico objetivo por la formación de un complejo oligonucleótido-lípido, como se describe en WO

15 90/10448. El complejo oligonucleótido-lípido sentido o antisentido se disocia preferiblemente dentro de la célula por una lipasa endógena.

Las moléculas de ARN o ADN antisentido o sentido generalmente son de al menos alrededor de 5 bases en

20 longitud, alrededor de 10 bases en longitud, alrededor de 15 bases en longitud, alrededor de 20 bases en longitud, alrededor de 25 bases en longitud, alrededor de 30 bases en longitud, alrededor de 35 bases en longitud, alrededor de 40 bases en longitud, alrededor de 45 bases en longitud,

25 alrededor de 50 bases en longitud, alrededor de 55 bases en

longitud, alrededor de 60 bases en longitud, alrededor de 65 bases en longitud, alrededor de 70 bases en longitud, alrededor de 75 bases en longitud, alrededor de 80 bases en longitud, alrededor de 85 bases en longitud, alrededor de 90 bases en longitud, alrededor de 95 bases en longitud, alrededor de 100 bases en longitud, o más.

Las sondas también pueden emplearse en técnicas PCR para generar un grupo de secuencias para la identificación de secuencias que codifican IL-17A/F cercanamente relacionados.

Las secuencias de nucleótidos que codifican un IL-17A/F también pueden usarse para sondas de hibridización de construcciones para mapear el gen que codifica tal IL-17A/F y para el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótido proporcionadas en la presente pueden mapearse a un cromosoma y regiones específicas del cromosoma usando técnicas conocidas, tales como hibridización in situ, análisis de ligado contra marcadores cromosomales conocidos, y separación por exclusión de hibridización con colecciones.

Cuando las secuencias de codificación para IL-17A/F codifica una proteína que enlaza a otra proteína (ejemplo, donde la proteína es un receptor), la proteína puede usarse en ensayos para identificar las otras proteínas o moléculas involucradas en la interacción de enlace. Por tales métodos, los inhibidores de la interacción de enlace receptor/ligando

pueden identificarse. Las proteínas involucradas en tales interacciones de enlace pueden usarse para separar por exclusión el péptido o inhibidores o agonistas de molécula pequeña de la interacción de enlace. También, la proteína del receptor puede usarse para aislar ligando correlacionados. Los ensayos de separación por exclusión pueden diseñarse para encontrar compuestos líderes que imitan la actividad biológica del IL-17A/F nativo o un receptor para IL-17A/F. Tales ensayos de separación por exclusión incluyen ensayos receptivos para separación por exclusión de alto desempeño de colección químicas, haciéndolas particularmente apropiadas para identificar cantidades de fármaco de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos orgánico o inorgánicos sintéticos. Los ensayos pueden realizarse en una variedad de formatos, incluyendo ensayos de enlace proteína-proteína, ensayos de separación por exclusión bioquímicos, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en el arte.

Los ácidos nucleicos que codifican IL-17A/F o sus formas modificadas también pueden usarse para generar ya sea animales transgénicos o animales "con genes inactivados" que, de nuevo, son útiles en el desarrollo y separación por exclusión de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o rata) es un animal que tiene células que contienen un transgen, cuyo transgen se

introdujo en el animal o un ancestro del animal en una etapa prenatal, por ejemplo embriónica. El transgen es un ADN que se integra en el genoma de la célula de la cual se desarrolla el animal. En una realización, el cADN que
5 codifica IL-17A/F puede usarse para clonar ADN genómico que codifica IL-17A/F de conformidad con las técnicas establecidas y las secuencias genómicas usadas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN que codifica IL-17A/F. Los métodos para generar animales
10 transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han vuelto convencionales en el arte y se describen, por ejemplo, en las patentes de E.U.A. Nos. 4,736,866 y 4,870,009. Típicamente, las células particulares deberán dirigirse a la incorporación del transgen IL-17A/F
15 con aumentadores específicos de tejido. Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgen que codifica IL-17A/F introducido en la línea madre del animal en una etapa embriónica puede usarse para examinar el efecto de la expresión incrementada de ADN que codifica IL-17A/F. Tales
20 animales pueden usarse como animales de prueba para reactivos pensando en conferir protección de, por ejemplo, condiciones patológicas asociadas con su sobreexpresión. De acuerdo con esta faceta de la invención, un animal se trata con el reactivo y una incidencia reducida de la condición
25 patológica, en comparación con animales no tratados que

portan el transgen, indicaría una intervención terapéutica potencial para la condición patológica.

Alternativamente, los homólogos no humanos de IL-17A/F pueden usarse para construir un animal "con genes inactivados" IL-17A/F que tiene un gen defectuoso o alterado que codifica IL-17A/F como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica IL-17A/F y el ADN genómico alterado que codifica IL-17A/F introducido en una célula madre embrionaria del animal. Por ejemplo, el cADN que codifica IL-17A/F puede usarse para clonar ADN genómico que codifica IL-17A/F de acuerdo con técnicas establecidas. Una porción del ADN genómico que codifica IL-17A/F puede eliminarse o reemplazarse con otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que puede usarse para monitorear la integración. Típicamente, varios kilobases de ADN flanqueado no alterado (tanto en los extremos 5' como 3') se incluyen en el vector [ver por ejemplo, Thomas and Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) para la descripción de vectores de recombinación homólogos]. El vector se introduce en una línea de célula madre embrionaria (por ejemplo, por electroporación) y células en las cuales el ADN introducido que tiene homología recombinante con el ADN endógeno se seleccionan [ver, por ejemplo, Li *et al.*, *Cell*, 69:915 (1992)]. Las células seleccionadas se inyectan entonces en un blastocisto de un animal (por ejemplo, un ratón o rata)

para formar quimeras de agregación [ver, por ejemplo, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. Un embrión quimérico puede entonces implantarse
5 en un animal de acogida hembra pseudopreñado apropiado y el embrión llevarse al término para crear un animal "con genes inactivados". La progenie que porta el ADN homológamente recombinante en sus células madre puede identificarse por técnicas estándar y usarse para engendrarse animales en los
10 cuales todas las células del animal contienen el ADN homológamente recombinante. Los animales con genes inactivados pueden caracterizarse por ejemplo, por su capacidad para defenderse contra ciertas condiciones patológicas y para su desarrollo de condiciones patológicas
15 debido a la ausencia del polipéptido IL-17A/F.

El ácido nucleico que codifica los polipéptidos IL-17A/F también puede usarse en la terapia de genes. En las aplicaciones de terapia de genes, los genes se introducen en células con objeto de alcanzar la síntesis in vivo de un
20 producto genérico terapéuticamente efectivo, por ejemplo para reemplazar un gen defectuoso. "Terapia de genes" incluye tanto terapia de genes convencional donde el efecto final se alcanza por un tratamiento sencillo, y la administración de agentes terapéuticos de genes, que involucra la
25 administración de una vez o repetida de un ADN o ARN

terapéuticamente efectivo. Los ARN y ADN antisentido pueden usarse como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes in vivo. Ya se ha mostrado que los oligonucleótidos antisentido pueden importarse en células
5 donde actúan como inhibidores, a pesar de sus concentraciones intracelulares bajas causadas por su absorción restringida por la membrana celular. (Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:4143-4146 [1986]). Los oligonucleótidos pueden modificarse para aumentar su absorción, por ejemplo, al
10 sustituir sus grupos fosfodiéster negativamente cargados por grupos no cargados.

Hay una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere en células
15 de cultivo in vitro, o in vivo en las células del hospedero pretendido. Las técnicas apropiadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero in vitro incluye el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEA-dextrano, el método de precipitación de fosfato
20 de calcio, etc. Las técnicas de transferencia de genes in vivo actualmente preferidas incluyen transfección con vectores virales (típicamente retrovirales) y transfección mediada por proteína-liposoma de cubierta viral (Dzau et al., Trends in Biotechnology, 11: 205-210 [1993]). En algunas
25 situaciones, es deseable proporcionar la fuente de ácido

nucleico con un agente que dirige las células objetivo, tal como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de superficie celular o la célula objetivo, un ligando para el receptor en la célula objetivo, etc. Donde las liposomas
5 se emplean, las proteínas que enlazan a una proteína de membrana de superficie celular asociada con endocitosis pueden usarse para dirigir y/o para facilitar la absorción, por ejemplo, proteínas de capsida o fragmentos de los mismos trópicos para un tipo celular particular, anticuerpos para
10 proteínas que experimentan internalización en ciclización, proteínas que dirigen la localización intracelular y aumentan la vida media intracelular. La técnica de endocitosis mediada por el receptor se describe, por ejemplo, por Wu *et al.*, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432 (1987); y Wagner *et al.*, Proc.
15 Natl. Acad. Sci. USA, 87: 3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos de terapia de genes y marcado de genes ver Anderson *et al.*, Science, 256: 808-813 (1992).

Los polipéptidos IL-17A/F descritos en la presente también pueden emplearse como marcadores de peso molecular
20 para propósitos de electroforesis de proteína y las secuencias de ácido nucleico aisladas pueden usarse para expresar recombinantemente aquellos marcadores.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos IL-17A/F o fragmentos de los mismos descritos en
25 la presente son útiles para identificación de cromosoma. A

este respecto, existe una necesidad en curso para identificar marcadores de cromosoma nuevos, ya que relativamente algunos reactivos marcadores de cromosoma, basado en los datos de secuencia actuales, están actualmente disponibles. Cada
5 molécula IL-17A/F de ácido nucleico de la presente invención puede usarse como un marcador de cromosoma.

Los polipéptidos IL-17A/F y las moléculas de ácido nucleico de la presente invención también pueden usarse en diagnóstico para histotipado, en donde los polipéptidos IL-
10 17A/F de la presente invención pueden expresarse diferencialmente en un tejido en comparación a otro, preferiblemente en un tejido enfermo en comparación con tejido normal del mismo tipo de tejido. Las moléculas de ácido nucleico IL-17A/F encuentran uso para generar sondas
15 para PCR, análisis Northern, análisis Southern y análisis Western.

Los polipéptidos IL-17A/F descritos en la presente también pueden emplearse como agentes terapéuticos. Los polipéptidos IL-17A/F de la presente invención pueden
20 formularse de conformidad con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, por ello el producto IL-17A/F de esto se combina en mezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones terapéuticas se preparan para almacenar al mezclar el
25 ingrediente activo que tiene el grado deseado de pureza con

portadores excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales, (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980)), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los
5 portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos al receptor a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen soluciones amortiguadoras tales como citrato de fosfato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos
10 de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen
15 glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o PEG.

Las formulaciones a usarse para administración in vivo
20 deberán ser estériles, esto se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución.

Las composiciones terapéuticas en la presente generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto
25 de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución

intravenosa que tienen un tapón que puede hacerse orificio por una aguja de inyección hipodérmica.

La vía de administración está de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por rutas
5 intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, administración tópica, o por sistemas de liberación sostenida.

Las dosis y concentraciones de fármaco deseadas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden
10 variar dependiendo del uso particular pretendido. La determinación de la dosis o ruta de administración apropiada están dentro de la habilidad de un médico ordinario. Los experimentos animales proporcionan una guía confiable para la determinación de dosis efectivas para terapia humana. El
15 escalado entre especies de dosis efectivas puede realizarse siguiendo los principios ofrecidos por Mordenti, J. and Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" en *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi et al., Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-
20 96.

Cuando la administración in vivo de un polipéptido IL-17A/F o agonista o antagonista del mismo se emplea, las cantidades de dosis normal pueden variar desde alrededor de 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más
25 por día, preferiblemente alrededor de 1 µg/kg/día hasta 10

mg/kg/día, dependiendo de la ruta de administración. Las guías para dosis particulares y métodos de administración se proporciona en la literatura; ver, por ejemplo, Patentes E.U.A. Nos. 4,657,760; 5,206,344; o 5,225,212. Se anticipa
5 que diferentes formulaciones serán efectivas para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, que la administración dirigida a un órgano o tejido, por ejemplo, puede necesitar la administración en una manera diferente de tal u otro órgano o tejido.

10 Donde la administración de liberación sostenida de un polipéptido IL-17A/F se desea en una formulación con características de liberación apropiadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastornos que requiere la administración del polipéptido IL-17A/F, la
15 microencapsulación del polipéptido IL-17A/F se contempla. La microencapsulación de proteínas recombinantes para liberación sostenida se ha realizado exitosamente con hormona de crecimiento humano (rhGH), interferon- (rhIFN-), interleucina-2, y MN rgp120. Johnson *et al.*, *Nat. Med.*,
20 2:795-799 (1996); Yasuda, *Biomed. Ther.*, 27:1221-1223 (1993); Hora *et al.*, *Bio/Technology*, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," in *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell and Newman,
25 eds, (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; WO

97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; y Patente E.U.A. No. 5,654,010.

Las formulaciones de liberación sostenida de estas proteínas se desarrollaron usando polímero de ácido poli-
5 láctico-glicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y amplio rango de propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, ácidos láctico y glicólico, pueden liberarse rápidamente dentro del cuerpo humano. Por otro lado, la capacidad de degradación de este polímero puede
10 ajustarse desde meses hasta años dependiendo de su peso molecular y composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," en: M. Chasin and R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), pp. 1-41.

15 Esta invención abarca métodos para separar por exclusión compuestos para identificar aquellos que imitan el polipéptido IL-17A/F (agonistas) o previenen el efecto del polipéptido IL-17A/F (antagonistas). Los ensayos de separación por exclusión para candidatos de fármaco
20 antagonistas se diseñan para compuestos identificados que enlazan o hacen complejo con los polipéptidos IL-17A/F codificados por los genes identificados en la presente, o de otra manera interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Tales
25 ensayos de separación por exclusión incluyen ensayos

receptivos para separación pro exclusión de alto desempeño de colecciones químicas, lo que los hace particularmente apropiados para identificar candidatos a fármaco de molécula pequeña.

5 Los ensayos pueden realizarse en una variedad de formatos, incluyendo ensayos de enlace proteína-proteína, ensayos de separación por exclusión bioquímicos, inmunoensayos, y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en el arte.

10 Todos los ensayos para antagonistas son comunes en que llaman a poner en contacto el candidato a fármaco con un polipéptido IL-17A/F codificado por un ácido nucleico identificado en la presente bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes
15 interactúen.

En los ensayos de enlace, la interacción se enlaza y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido IL-17A/F codificado por el gen identificado en la presente o el
20 candidato a fármaco se inmoviliza en una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación, por enlaces covalentes o no covalentes. El enlace no covalentes generalmente se realiza al cubrir la superficie sólida con una solución del polipéptido IL-17A/F y secar.
25 Alternativamente, un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un

anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido IL-17A/F a inmovilizarse puede usarse para anclarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza al agregar el componente no inmovilizado, que puede etiquetarse por una
5 etiqueta detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando la reacción se completa, los componentes no reactivos se remueven, por ejemplo, al lavar, y los complejos anclados en la superficie sólida se detectan. Cuando el componente
10 originalmente no inmovilizado porta una etiqueta detectable, la detección de la etiqueta inmovilizada en la superficie indica que la formación en complejo se presenta. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no porta una etiqueta, la formación en complejo puede detectarse, por
15 ejemplo, al usar un anticuerpo etiquetado que enlaza específicamente el complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato interactúa con, pero no enlaza a, un polipéptido IL-17A/F particular codificado por el gen identificado en la presente, su interacción con tal
20 polipéptido puede evaluarse por métodos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Tales ensayos incluyen enfoques tradicionales, tales como, por ejemplo, reticulación, co-inmunoprecipitación, y co-purificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las
25 interacciones proteína-proteína pueden monitorearse usando un

sistema genético basado en levadura descrito por Fields y colaboradores (Fields and Song, *Nature* (London), 340:245-246 [1989]); Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 [1991]) como se describe por Chevray and Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como levadura GAL4, consisten de dos dominios modulares físicamente discretas. El sistema de expresión de levadura descrito en las publicaciones anteriores (generalmente referido como el "sistema de dos híbridos") toma ventaja de esta propiedad, y emplea dos proteínas híbridas, una en la cual la proteína objetivo se fusiona al dominio de enlace de ADN de GAL4, y la otra, en la cual las proteínas que activan el candidato se fusionan al dominio de activación. La expresión del gen reportero GAL1-lacZ bajo control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad GAL4 por medio de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interactúan se detectan con un sustrato cromogénico para β -galactosidasa. Un kit completo (MATCHMAKERTM) para identificar las interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas que usa la técnica de dos híbridos está comercialmente disponible de Clontech. Este sistema también puede extenderse para mapear dominios de proteína involucrados en las interacciones de proteína específicas así como para determinar con precisión los

residuos de aminoácido que son cruciales para estas interacciones.

Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen que codifica un polipéptido IL-17A/F identificado en la presente y otros componentes intra- o extracelulares puede 5 probarse como sigue: usualmente una mezcla de reacción se prepara que contiene el producto del gen y el componente intra- o extracelular bajo condiciones y durante un tiempo que permita la interacción y enlace de los dos productos. 10 Para probar la capacidad del compuesto candidato para inhibir el enlace, la reacción se corre en ausencia y en presencia del compuesto de prueba. Además, el placebo puede agregarse a una tercera mezcla de reacción, para servir como control positivo. El enlace (formación en complejo) entre el 15 compuesto de prueba y el componente intra o extracelular presente en la mezcla se monitorea como se describe en la presente arriba. La formación de un complejo en las reacciones de control pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de prueba indica que el compuesto de 20 prueba interfiere con la interacción del compuesto de prueba y su compañero de reacción.

Para evaluar antagonistas, el polipéptido IL-17A/F puede agregarse a una célula junto con el compuesto a separarse por exclusión para una actividad particular y la capacidad del 25 compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia

del polipéptido IL-17A/F indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido IL-17A/F. Alternativamente, los antagonistas pueden detectarse al combinar el polipéptido IL-17A/F y un antagonista potencial con receptores de polipéptido IL-17A/F enlazados a la membrana o receptores recombinantes bajo condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitivo. El polipéptido IL-17A/F puede etiquetarse, tal como por radiactividad, de tal manera que el número de moléculas de polipéptido IL-17A/F enlazadas al receptor pueden usarse para determinar la efectividad del antagonista potencial. El gen que codifica el receptor puede identificarse por métodos numerosos conocidos por aquellos de experiencia en el arte, por ejemplo, toma de ligando y clasificación de FACS. Coligan *et al.*, Current Protocols in Immun., 1(2): Capítulo 5 (1991). Preferiblemente, la clonación por expresión se emplea en donde el ARN poliadenilado se prepara de una célula que responde al polipéptido IL-17A/F y una colección de cADN creada de este ARN se divide en grupos y se usa para transfectar células COS y otras células que no responden al polipéptido IL-17A/F. Las células transfectadas que se hacen crecer en portaobjetos de vidrio se exponen al polipéptido IL-17A/F etiquetado. El polipéptido IL-17A/F puede etiquetarse por una variedad de medio que incluyen yodación o inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína cinasa de sitio específico.

Después del fijado e incubación, los portaobjetos se someten a análisis autoradiográfico. Los grupos positivos se identifican y los subgrupos se preparan y vuelven a transfectar usando un proceso de sub-agrupado y re-separación por exclusión interactivo, proporcionando eventualmente un clon sencillo que codifica el receptor supuesto.

Como un enfoque alternativo para la identificación del receptor, el polipéptido IL-17A/F etiquetado puede ligarse por fotoafinidad con una membrana celular o preparaciones de extracto que expresan la molécula receptora. El material reticulado se resuelve por PAGE y se expone a una película de rayos X. El complejo etiquetado que contiene el receptor puede extirparse, resolverse en fragmentos de péptido y someterse a micro-secuenciado de proteína. La secuencia de aminoácido obtenida del micro-secuenciado se usará para diseñar un conjunto de sondas de oligonucleótido degeneradas para separar por exclusión una colección de cADN para identificar el gen que codifica el receptor supuesto.

En otro ensayo para antagonistas, las células de mamífero o una preparación de membrana que expresa el receptor se incubará con el polipéptido IL-17A/F etiquetado en presencia del compuesto candidato. La capacidad del compuesto para aumentar o bloquear esta interacción se medirá entonces.

Más ejemplos específicos de antagonistas potenciales incluyen un oligonucleótido que se enlaza a las fusiones de inmunoglobulina con el polipéptido IL-17A/F, y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos poli- y monoclonales y fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos anti-idiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de tales anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo. Alternativamente, el antagonista potencial puede ser una proteína cercanamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido IL-17A/F que reconoce el receptor pero no imparte efecto, por ello inhibiendo competitivamente la acción del polipéptido IL-17A/F.

Otro antagonista potencial del polipéptido IL-17A/F es un ARN antisentido o construcción de ADN preparado usando tecnología antisentido, donde, por ejemplo, un ARN antisentido o molécula de ADN actúa para bloquear directamente la traducción del mRNA al hibridizarse al mRNA objetivo y prevenir la traducción de la proteína. La tecnología antisentido puede usarse para controlar la expresión del gen a través de la formación de hélice triple o ADN o ARN antisentido, ambos de tales métodos se basan en enlazar un polinucleótido al ADN o ARN. Por ejemplo, la porción codificada 5' de la secuencia de polinucleótido, que codifica los polipéptidos IL-17A/F maduros en la presente, se

usa para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido desde
alrededor de 10 hasta 40 pares base de longitud. El
oligonucleótido de ADN se diseña para ser complementario a
una región del gen involucrado en la transcripción (hélice
5 triple - ver Lee *et al.*, Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979);
Cooney *et al.*, Science, 241:456 (1988); Dervan *et al.*,
Science, 251:1360 (1991)), por ello previniendo la
transcripción y la producción del polipéptido IL-17A/F. El
oligonucleótido de ARN antisentido hibridiza al mRNA in vivo
10 y bloquea la traducción de la molécula de mRNA en el
polipéptido IL-17A/F (antisentido - Okano, Neurochem., 56:560
(1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene
Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los
oligonucleótidos descritos arriba también pueden
15 administrarse a células de tal manera que el ARN o ADN
antisentido puede expresarse in vivo para inhibir la
producción del polipéptido IL-17A/F. Cuando se usa el ADN
antisentido, los oligodesoxiribonucleótidos derivados del
sitio de inicio de traducción, por ejemplo, entre alrededor
20 de -10 y +10 posiciones de la secuencia de nucleótido de gen
objetivo, se prefieren.

Los antagonistas potenciales incluyen moléculas pequeñas
que se enlazan al sitio activo, el sitio de enlace del
receptor, o el factor de crecimiento u otro sitio de enlace
25 relevante del polipéptido IL-17A/F, por ello bloqueando la

actividad biológica normal del polipéptido IL-17A/F. Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, péptidos pequeños o moléculas tipo péptido, preferiblemente péptidos solubles, y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos.

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar el desdoblamiento específico del ARN. Las ribozimas actúan por hibridización específica de secuencia al ARN objetivo complementario, seguido por desdoblamiento endonucleotídico. Los sitios de desdoblamiento de ribozima específicos con un ARN dirigido potencial pueden identificarse por técnicas conocidas. Para mayor detalle ver, por ejemplo, Rossi, *Current Biology*, 4:469-471 (1994), y publicación PCT No. WO 97/33551 (publicada el 18 de Septiembre 1997).

Las moléculas de ácido nucleico en formación de hélice triple usadas para inhibir la transcripción deberán ser de hebra sencilla y estar compuestas de desoxinucleótidos. La composición base de estos oligonucleótidos se diseña de tal manera que promueve la formación de hélice triple por medio de reglas de emparejamiento de base de Hoogsteen, que generalmente requieren estiramiento en tamaño de purinas o pirimidinas en una hebra del dúplex. Para mayor detalle ver, por ejemplo, publicación PCT No. WO 97/33551, *supra*.

Estas moléculas pequeñas pueden identificarse por cualesquiera de uno o más ensayos de separación por exclusión discutidos en la presente arriba y/o por cualesquiera de otras técnicas de separación por exclusión bien conocidas por aquellos de habilidad en el arte.

Los diagnósticos y usos terapéuticos de las moléculas descritas en la presente pueden también basarse en las líneas de ensayo funcional positivo descubiertas y descritas a continuación.

10 F. Distribución de Tejidos

La ubicación de los tejidos que expresan el IL-17A/F pueden identificarse al determinar la expresión de mRNA en varios tejidos humanos. La ubicación de tales genes proporciona información a cerca de que tejidos son más probablemente afectados por las actividad estimulantes e inhibidoras de los polipéptidos IL-17A/F. La ubicación de un gen en un tejido específico también proporciona la muestra de tejido para los ensayos de bloqueo de actividad discutidos abajo.

20 Como se señala antes, la expresión de genes en varios tejidos puede medirse por inmunotransferenciaSouthern convencional, inmunotransferencia Northern para cuantificar la transcripción de mRNA (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 [1980]), inmunotransferenciade punto

(análisis de ADN), o hibridización *in situ*, usando una sonda apropiadamente etiquetada, con base en las secuencias proporcionadas en la presente. Alternativamente, los anticuerpos pueden emplearse de manera que pueden reconocer
5 dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN, y dúplex híbrido de ADN-ARN o dúplex ADN-proteína.

La expresión de genes en varios tejidos, alternativamente, puede medirse por métodos inmunológicos, tales como teñido inmunohistoquímico de secciones de tejido y
10 ensayos de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto de genes. Los anticuerpos útiles para teñido inmunohistoquímico y/o ensayo de fluidos de muestra pueden ser ya sea monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero.
15 Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra una secuencia nativa de un polipéptido IL-17A/F o contra un péptido sintético con base en las secuencias de ADN que codifican el polipéptido IL-17A/F o contra una secuencia exógena fusionada a un ADN que codifica un polipéptido IL-
20 17A/F y que codifica un epítipo de anticuerpo específico. Las técnicas generales para anticuerpos generados, y protocolos especiales para inmunotransferencia Northern e hibridización *in situ* se proporcionan abajo.

25 G. Estudios de Enlace de Anticuerpos

La actividad de los polipéptidos IL-17A/F puede verificarse además por estudios de enlace de anticuerpo en los cuales la capacidad de los anticuerpos anti-IL-17A/F para inhibir el efecto de los polipéptidos IL-17A/F, respectivamente, en células de tejido se prueba. Los anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos, y heteroconjugados, la preparación de los cuales se describe en la presente abajo.

Los estudios de enlace de anticuerpos pueden llevarse a cabo en cualesquiera de los métodos de ensayo conocidos, tales como ensayos de enlace competitivos, ensayos de intercalado indirecto, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

Los ensayos de enlace competitivos dependen de la capacidad de un estándar etiquetado para competir con el analito de muestra de prueba para enlazarse con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína objetivo en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de estándar que se enlaza a los anticuerpos. Para determinar fácilmente la cantidad de estándar que se enlaza, los anticuerpos preferiblemente son insolubles antes o después de completar, de manera que el estándar y el analito que se enlazan a los anticuerpos pueden separarse

convenientemente del estándar y el analito que se mantiene sin enlazar.

Los ensayos de intercalado involucran el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de enlazarse a una porción
5 inmunogénica diferente, o epítipo, de la proteína a detectarse. En un ensayo de intercalado, el analito de muestra de prueba se enlaza por un primer anticuerpo que se inmoviliza en un soporte sólido, y posteriormente un segundo anticuerpo se enlaza al analito, formando de esta manera un
10 complejo de tres partes insoluble. Ver, por ejemplo, Patente E.U.A. No. 4,376,110. El segundo anticuerpo puede por sí mismo etiquetarse con una porción detectable (ensayos de intercalado directo) o puede medirse usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que se etiqueta con una porción
15 detectable (ensayo de intercalado indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de intercalado es un ensayo ELISA, en cuyo caso la porción detectable es una enzima. Para inmunohistoquímica, la muestra de tejido puede ser fresca o congelada o pueden insertarse en parafina y fijarse con un
20 conservador tal como formalina, por ejemplo.

H. Ensayos Basados en Células

Los ensayos basados en células y modelos de animal para enfermedades relacionadas con lo inmune pueden usarse para
25 entender además la relación entre los genes y los

polipéptidos identificados en la presente y el desarrollo y patogénesis de la enfermedad relacionada con lo inmune.

En un enfoque diferente, las células de un tipo de célula conocido por estar involucrada en una enfermedad
5 relacionada con lo inmune particular se transfectan con los cADN descritos en la presente, y la capacidad de estos cADN para estimular o inhibir la función inmune se analiza. Las células apropiadas se transfectan con el gen deseado, y se monitorean para actividad de función inmune. Tales líneas de
10 célula transfectadas pueden entonces usarse para probar la capacidad de anticuerpos poli o monoclonales o composiciones de anticuerpo para inhibir o estimular la función inmune, por ejemplo, para modular la proliferación de célula T o infiltración de célula inflamatoria. Las células
15 transfectadas con las secuencias codificadas de los genes identificados en la presente pueden además usarse para identificar candidatos a fármaco para el tratamiento de enfermedades relacionadas con lo inmune.

Además, los cultivos primarios derivados de animales
20 transgénicos (como se describe abajo) pueden usarse en ensayos basados en células en la presente, no obstante que se prefieren líneas de células estables. Las técnicas para derivar líneas de células continuas de animales transgénicos son bien conocidas en el arte (ver, por ejemplo, Small et
25 al., Mol. Cell. Biol., 5: 642-648 [1985]).

Un ensayo basado en células apropiado es la reacción de linfocito mezclada (MLR). Current Protocols in Immunology, unidad 3.12; editado por J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober, National Institutes of Health, Publicada por John Wiley & Sons, Inc. En este ensayo, la capacidad del compuesto de prueba para estimular o inhibir la proliferación de células T activadas se evalúa. Una suspensión de las células T de respuesta se cultiva con células estimuladoras alogénicas y la proliferación de células T se mide por la absorción de timidina titulada. Este ensayo es una medida general de reactividad de células T. Ya que la mayoría de células T responde a y produce IL-2 durante la activación, las diferencias en capacidad de respuesta en este ensayo refleja en parte las diferencias en la producción de IL-2 por las células de respuesta. Los resultados de MLR pueden verificarse por un ensayo de detección de linfocina estándar (IL-2). Current Protocols in Immunology, , 3.15, 6.3.

Una respuesta de célula T proliferativa en un ensayo MLR puede deberse a propiedades mitogénicas directas de una molécula evaluada o a la activación inducida por antígeno externa. La verificación adicional de la actividad estimuladora de célula T de los polipéptidos IL-17A/F puede obtenerse por un ensayo coestimulador. La activación de célula T requiere una señal específica de antígeno mediada a

través del receptor de célula T (TCR) y una señal coestimulante mediada a través de la interacción de enlace del segundo ligando, por ejemplo, la interacción de enlace B7 (CD80, CD86)/CD28. El CD28 reticulado incrementa la secreción de linfocina por células T activadas. La activación de células T tiene controles tanto negativos como positivos a través del enlace de ligandos que tienen un efecto negativo o positivo. El CD28 y CTLA-4 son glicoproteínas relacionadas en la superfamilia Ig que se enlazan a B7. El CD28 enlazado a B7 tiene un efecto de coestimulación positivo de activación de célula T; a la inversa, el enlace de CTLA-4 a B7 tiene un efecto desactivante de célula T negativo. Chambers, C. A. and Allison, J. P., *Curr. Opin. Immunol.*, (1997) 9:396. Schwartz, R. H., *Cell* (1992) 71:1065; Linsley, P. S. and Ledbetter, J. A., *Annu. Rev. Immunol.* (1993) 11:191; June, C. H. et al., *Immunol. Today* (1994) 15:321; Jenkins, M. K., *Immunity* (1994) 1:405. En un ensayo de coestimulación, los polipéptidos IL-17A/F se evalúan para actividad coestimuladora o inhibidora de células T.

Los polipéptidos IL-17A/F, así como otros compuestos de la invención, que son estimuladores (coestimuladores) de la proliferación de célula T y agonistas, por ejemplo, anticuerpos agonistas, de esto como se determina por MLR y ensayos coestimuladores, por ejemplo, son útiles para tratar enfermedades relacionadas con lo inmune caracterizadas por

una función inmune pobre, subóptima o inadecuada. Estas enfermedades se tratan al estimular la proliferación y activación de células T (e inmunidad mediada por célula T) y aumenta la respuesta inmune en un mamífero a través de la
5 administración de un componente estimulante, tal como los polipéptidos IL-17A/F estimulantes. El polipéptido estimulante puede, por ejemplo, ser un polipéptido IL-17A/F o un anticuerpo agonista del mismo.

El uso directo de un compuesto estimulante como en la
10 invención se ha validado en experimentos con glicoproteína 4-1BB, un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis de tumor, que se enlaza al ligando (4-1BBL) expresado en células T cebadas y señales de activación y crecimiento de célula T. Alderson, M. E. *et al.*, J. Immunol.,
15 24:2219 (1994).

El uso de un compuesto estimulante de agonista también se ha validado experimentalmente. La activación de 4-1BB por el tratamiento con anticuerpo anti-4-1BB agonista aumenta la erradicación de tumores. Hellstrom, I. and Hellstrom, K. E.,
20 Crit. Rev. Immunol., 18:1 (1998). La terapia inmunoadyuvante para el tratamiento de tumores, descrita en más detalle abajo, es otro ejemplo del uso de los compuestos estimulantes de la invención. Un efecto estimulante o que aumenta lo inmune también puede alcanzarse al antagonizar o bloquear la
25 actividad de un IL-17A/F que se ha encontrado que se inhibe

en el ensayo MLR. Negar la actividad inhibidora del compuesto produce un efecto estimulante puro. Los compuestos antagonistas/de bloqueo apropiados son anticuerpos o fragmentos de los mismos que reconocen y se enlazan a la proteína inhibidora, por ello bloqueando la interacción efectiva de la proteína con su receptor e inhibiendo la señalización a través del receptor. Este efecto se ha validado en experimentos usando anticuerpos anti-CTLA-4 que aumentan la proliferación de célula T, presumiblemente al remover la señal inhibidora causada por el enlace CTLA-4. Walunas, T. L. et al., *Immunity*, 1:405 (1994).

Alternativamente, un efecto estimulante o que aumenta lo inmune puede también alcanzarse por la administración de un polipéptido IL-17A/F que tiene propiedades de aumento de permeabilidad. La permeabilidad vascular aumentada sería benéfica para trastornos que pueden aligerarse por infiltración local de células inmunes (por ejemplo, monocitos, eosinófilos, PMN) e inflamación.

Por otro lado, los polipéptidos IL-17A/F, así como otros compuestos de la invención, que son inhibidores directos de la proliferación/activación de célula T, secreción de linfoquina, y/o permeabilidad vascular pueden usarse directamente para suprimir la respuesta inmune. Estos compuestos son útiles para reducir el grado de respuesta inmune y para tratar enfermedades relacionadas con lo inmune

caracterizadas por una respuesta hiperactiva, superóptima, o autoinmune. Este uso de los compuestos de la invención se ha validado por los experimentos descritos arriba en los cuales CTLA-4 se enlaza a las células T que desactivan el receptor B7. Los compuestos inhibidores directos de la invención funcionan de una manera análoga. El uso del compuesto que suprime la permeabilidad vascular se esperaría que reduzca la inflamación. Tales usos serían benéficos en el tratamiento de condiciones asociadas con inflamación excesiva.

Alternativamente, los compuestos, por ejemplo, anticuerpos, que se enlazan a polipéptidos IL-17A/F estimulantes y bloquean el efecto estimulante de estas moléculas producen un efecto inhibidor puro y pueden usarse para suprimir la respuesta inmune mediada por células T al inhibir la proliferación /activación de células T y/o secreción de linfocina. El bloqueo del efecto inmune de los polipéptidos suprime la respuesta inmune del mamífero. Este uso se ha validado en experimento usando un anticuerpo anti-IL2. En estos experimentos, el anticuerpo se enlaza a IL2 y bloquea el enlace de IL2 a su receptor por ello alcanzando un efecto inhibidor de célula T.

I. Modelos Animales

Los resultados de los ensayos in vitro basados en células pueden verificarse además usando modelos y ensayos

animales in vivo para función de células T. Una variedad de modelos animales bien conocidos pueden usarse para entender además el papel de los genes identificados en la presente en el desarrollo y patogénesis de enfermedades relacionadas con lo inmune, y para probar la eficacia de los agentes terapéuticos candidatos, incluyendo anticuerpos, y otros antagonistas de los polipéptidos nativos, incluyendo antagonistas de molécula pequeña. La naturaleza in vivo de tales modelos los hace predictivos de respuestas en pacientes humanos. Los modelos animales de enfermedades relacionadas con lo inmune incluyen animales tanto no recombinantes como recombinantes (transgénicos). Los modelos animales no recombinantes incluyen, por ejemplo, roedores, por ejemplo, modelos murinos. Tales modelos pueden generarse al introducir células en ratones singénicos usando técnicas estándar, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección a la vena de la cola, implante de bazo, implante intraperitoneal, implante bajo la cápsula renal, etc.

La enfermedad injerto contra huésped se presenta cuando se transplantan células inmunocompetentes en pacientes inmunodeprimidos o tolerantes. Las células donadoras reconocen y responden a antígenos hospederos. La respuesta puede variar desde inflamación severa que amenaza la vida hasta casos suaves de diarrea y pérdida de peso. Los modelos de enfermedad injerto contra huésped proporcionan un medio

para evaluar la reactividad de células T contra antígenos MHC y antígenos de transplante menor. Un procedimiento apropiado se describe en detalle en Current Protocols in Immunology, arriba, unidad 4.3.

5 Un modelo animal para rechazo al aloinjerto de piel es un medio para probar la capacidad de las células T para mediar la destrucción de tejido in vivo y para medir su papel en el rechazo al transplante. Los modelos más comunes y aceptados usan injertos de cola-piel de murino. Los
10 experimentos repetidos han mostrado que el rechazo al aloinjerto de piel se media por las células T, células T auxiliares y células T eliminadoras efectoras, y no anticuerpos. Auchincloss, H. Jr. and Sachs, D. H., Fundamental Immunology, 2^a ed., W. E. Paul ed., Raven Press,
15 NY, 889-992 (1989). Un procedimiento apropiado se describe en detalle en Current Protocols in Immunology, arriba, unidad 4.4. Otros modelos de rechazo al transplante que pueden usarse para probar los compuestos de la invención son los modelos de transplante de corazón alogénicos descritos por
20 Tanabe, M. *et al.*, Transplantation, 58:23 (1994) y Tinubu, S. A. *et al.*, J. Immunol., 4330-4338 (1994).

Los modelos animales para hipersensibilidad de tipo retardada proporcionan un ensayo de la función inmune mediada por célula como tal. Las reacciones de hipersensibilidad de
25 tipo retardado son una respuesta inmune in vivo mediada por

célula T caracterizada por inflamación que no alcanza un pico de unidad después de que un periodo de tiempo ha transcurrido después de la estimulación con un antígeno. Estas reacciones también se presentan en enfermedades autoinmunes específicas
5 de tejido tales como esclerosis múltiple (MS) y encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE, un modelo para MS). Un procedimiento apropiado se describe en detalle en Current Protocols in Immunology, arriba, unidad 4.5.

La EAE es una enfermedad autoinmune mediada por células
10 T caracterizada por la inflamación de célula T y células mononucleares y la desmielinización posterior de axones en el sistema nervioso central. La EAE generalmente se considera que es un modelo animal relevante para MS en humanos. Bolton, C., Multiple Sclerosis, 1:143 (1995). Se han desarrollado
15 modelos tanto agudos como que mantienen la liberación. Los compuestos de la invención pueden probarse para actividad estimuladora o inhibidora de células T contra enfermedad desmielinizante mediada por lo inmune usando el protocolo descrito en Current Protocols in Immunology, arriba, unidades
20 15.1 y 15.2. Ver también los modelos de enfermedad de mielina en la cual los oligodendrocitos o células Schwann se injertan en el sistema nervioso central como se describe en Duncan, I. D. et al., Molec. Med. Today, 554-561 (1997).

La hipersensibilidad por contacto es un ensayo in vivo
25 de hipersensibilidad de tipo retardada sencilla de función

inmune mediada por célula. En este procedimiento, la exposición cutánea a haptenos exógenos que resulta en una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada que se mide y cuantifica. La sensibilidad por contacto involucra una fase
5 de sensibilidad inicial seguida por una fase de desencadenado. La fase de desencadenado se presenta cuando los linfocitos T encuentran un antígeno con el cual han tenido contacto previo. Se presenta inflamación e hinchazón, haciendo este un modelo excelente de dermatitis de contacto
10 alérgica humana. Un procedimiento apropiado se describe en detalle en *Current Protocols in Immunology*, Eds. J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach and W. Strober, John Wiley & Sons, Inc., unidad 4.2 (1994). También en Grabbe, S. and Schwarz, T, *Immun. Today*, 19 (1):
15 37-44 (1998).

Un modelo animal para artritis es la artritis inducida por colágeno. Este modelo comparte las características clínicas, histológicas e inmunológicas de la artritis reumatoide autoinmune humana y es un modelo aceptable para
20 artritis autoinmune humana. Los modelos de ratón y rata se caracterizan por sinovitis, erosión del cartílago y hueso subcondral. Los compuestos de la invención pueden probarse para actividad contra artritis autoinmune usando los protocolos descritos en *Current Protocols in Immunology*,
25 arriba, unidades 15.5. Ver también el modelo que usa un

anticuerpo monoclonal para CD18 e integrinas VLA-4 descrito en Issekutz, A.C. et al., Immunology, 88:569 (1996).

Un modelo de asma se ha descrito en el cual la hiperreactividad de vías respiratorias inducida por antígeno, eosinofílica pulmonar e inflamación se induce al sensibilizar un animal con ovalbúmina y luego estimular al animal con la misma proteína administrada en aerosol. Varios modelos animales (conejiillos de indias, rata, primate no humano) muestran síntomas similares a la asma atópica en humanos durante la estimulación con antígenos en aerosol. Los modelos de murino tienen muchas de las características de asma humana. Los procedimientos apropiados para probar los compuestos de la invención para actividad y efectividad en el tratamiento del asma se describe por Wolyniec, W. W. et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 18:777 (1998) y referencias citadas en la presente.

Adicionalmente, los compuestos de la invención pueden probarse en modelos animales para enfermedades tipo psoriasis. La evidencia sugiere una patogénesis de células T para psoriasis. Los compuestos de la invención pueden probarse en el modelo de ratón scid/scid descrito por Schon, M. P. et al., Nat. Med., 3:183 (1997), en el cual los ratones demuestran lesiones en la piel histopatológicas semejantes a la psoriasis. Otro modelo apropiado es el quimera de piel

humana/ratón scid preparado como se describe por Nickoloff, B. J. *et al.*, Am. J. Path., 146:580 (1995).

Los modelos de animal recombinante (transgénico) pueden producirse por ingeniería al introducir la porción codificada
5 de los genes identificada en la presente en el genoma de animales de interés, usando técnicas estándar para producir animales transgénicos. Los animales que sirven como un objetivo para manipulación transgénica incluyen, sin limitación, ratones, ratas, conejos, conejillos de indias,
10 cabras, cerdos, y primates no humanos, por ejemplo, babuinos, chimpancés y monos. Las técnicas conocidas en el arte para introducir un transgen en tales animales incluye microinyección pronucleica (Hoppe and Wanger, patente de E.U.A. No. 4,873,191); transferencia de genes mediada por
15 retrovirus en líneas de reproducción (por ejemplo, Van der Putten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 82, 6148-615 [1985]); genes dirigidos en células reproductoras embrionicas (Thompson *et al.*, Cell, 56, 313-321 [1989]); electroporación de embriones (Lo, Mol. Cel. Biol., 3, 1803-1814 [1983]);
20 transferencia de genes mediada por esperma (Lavitrano *et al.*, Cell, 57, 717-73 [1989]). Para revisión, ver, por ejemplo, patente de E.U.A. No. 4,736,866.

Para los propósitos de la presente invención, los animales transgénicos incluyen aquellos que portan el
25 transgen sólo en parte de sus células ("animales mosaico").

El transgen puede integrarse ya sea como un transgen sencillo, o en concatámeros, por ejemplo tándems cabeza a cabeza o cabeza a cola. La introducción selectiva de un transgen en un tipo de célula particular también es posible
5 siguiendo, por ejemplo, la técnica de Lasko *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 6232-636 (1992).

La expresión del transgen en animales transgénicos puede monitorearse por técnicas estándar. Por ejemplo, el análisis de tinción Southern o amplificación PCR puede usarse para
10 verificar la integración del transgen. El nivel de expresión de mRNA puede entonces analizarse usando técnicas tales como hibridación *in situ*, análisis de tinción Northern, PCR, o inmunocitoquímica.

Los animales pueden además examinarse para señales de
15 patología de enfermedad inmune, por ejemplo, por examen histológicos para determinar la infiltración de células inmunes en tejidos específicos. Los experimentos de bloqueo también pueden realizarse en los cuales los animales transgénicos se tratan con los compuestos de la invención
20 para determinar la extensión de la estimulación de la proliferación de células T o inhibición de los compuestos. En estos experimentos, los anticuerpos de bloqueo que se enlazan al polipéptido IL-17A/F, preparados como se describe arriba, se administran al animal y el efecto en la función inmune se
25 determina.

Alternativamente, los animales "con genes inactivados" pueden construirse que tengan un gen defectuoso o alterado que codifica un polipéptido identificado en la presente, como resultado de recombinación homóloga entre el gen endógeno que
5 codifica el polipéptido y el ADN genómico alternado que codifica el mismo polipéptido introducido en una célula embriónica del animal. Por ejemplo, el cADN que codifica un polipéptido particular puede usarse para clonar el ADN genómico que codifica tal polipéptido de conformidad con
10 técnicas establecidas. Una porción del ADN genómico que codifica un polipéptido particular puede eliminarse o reemplazarse con otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que puede usarse para monitorear la integración. Típicamente, varios kilobases de ADN flanqueado
15 no alterado (tanto en los extremos 5' y 3') se incluyen en el vector [ver, por ejemplo, Thomas and Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homólogos]. El vector se introduce en una línea de célula de reproducción embriónica (por ejemplo, por electroporación) y
20 las células en las cuales el ADN introducido tiene homología recombinante con el ADN endógeno se seleccionan [ver, por ejemplo, Li et al., *Cell*, 69:915 (1992)]. Las células seleccionadas se inyectan entonces en un blastocisto de un animal (por ejemplo, un ratón o rata) para formar quimeras de
25 agregación [ver, por ejemplo Bradley, en *Teratocarcinomas and*

Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. Un embrión quimérico puede entonces implantarse en un animal de acogida hembra pseudopreñada y el embrión llevarse al término para crear un animal "con genes inactivados". La progenie que porta el ADN homológamente recombinante en sus células reproductoras puede identificarse por técnicas estándar y usarse para procrear animales en los cuales todas las células del animal contienen el ADN homológamente recombinante. Los animales con genes inactivados pueden caracterizarse por ejemplo, por su capacidad para defenderse contra ciertas condiciones patológicas y por su desarrollo de condiciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido.

J. Terapia InmunoAdyuvante

En una realización, los compuestos inmunoestimulantes de la invención pueden usarse en terapia inmunoadyacente para el tratamiento de tumores (cáncer). Se establece ahora que las células T reconocen antígenos específicos de tumor humano. Un grupo de antígenos de tumor, codificado por las familiar MAGE, BAGE y GAGE de los gen, son silentes en todos los tejidos normales adultos, pero se expresan en cantidades importantes en tumores, tales como melanomas, tumores de pulmón, tumores de cabeza y cuello, y carcinomas de vejiga. DeSmet, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:7149 (1996). Se ha mostrado que la coestimulación de células T

induce la regresión del tumor y una respuesta antitumor tanto in vitro como in vivo. Melero, I. et al., Nature Medicine, 3:682 (1997); Kwon, E. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 8099 (1997); Lynch, D. H. et al., Nature Medicine, 3:625
5 (1997); Finn, O. J. and Lotze, M. T., J. Immunol., 21:114 (1998). Los compuestos estimulantes de la invención pueden administrarse como adyuvantes, solos o junto con un agente regulador del crecimiento, agente citotóxico o agente quimioterapéutico, para estimular la proliferación/activación
10 de células T y una respuesta antitumor a antígenos de tumor. El agente regulador del crecimiento, citotóxico, o quimioterapéutico puede administrarse en cantidades convencionales usando regímenes de administración conocidos. La actividad inmunoestimulante por los compuestos de la
15 invención permite cantidades reducidas de agentes reguladores del crecimiento, citotóxicos, o quimioterapéuticos por ello reduciendo potencialmente la toxicidad al paciente.

K. Ensayos de Selección para Candidatos a Fármaco

20 Los ensayos de selección para candidatos a fármaco se diseñan para identificar compuestos que se enlazan a o forman complejo con los polipéptidos codificados por los genes identificados en la presente o un fragmento biológicamente activo del mismo, o de otra manera interfiere con
25 la interacción de los polipéptidos codificados con otras

proteínas celulares. Tales ensayos de selección incluyen ensayos receptivos a separación por exclusión de alto desempeño de colección químicas, haciéndolas particularmente
5 apropiadas para identificar candidatos a fármaco de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos orgánico o inorgánicos sintéticos, incluyendo péptidos, preferiblemente péptidos solubles, fusiones (poli)péptido-inmunoglobulina, y, en particular, anticuerpos
10 que incluyen, sin limitación, anticuerpos poli y monoclonales y fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos anti-idiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de tales anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo. Los ensayos
15 pueden realizarse en una variedad de formatos, incluyen ensayos de enlace proteína-proteína, ensayos de separación por exclusión bioquímica, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en el arte. Todos los ensayos son comunes en que llaman a poner en contacto el
20 candidato a fármaco con el polipéptido que codifica el ácido nucleico identificado en la presente bajo las condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen.

25 En ensayos de enlace, la interacción se enlaza y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido

codificado por el gen identificado en la presente o el candidato a fármaco se inmoviliza en una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación, por enlaces covalentes o no covalentes. El enlace no covalente
5 generalmente se realiza al cubrir la superficie sólida con una solución de polipéptido y secar. Alternativamente, un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específicos para el polipéptido a inmovilizarse puede usarse para anclarse a la superficie sólida. El ensayo
10 se realiza al agregar el componente no inmovilizado, que pueden etiquetarse por una etiqueta detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta contiene el componente anclado. Cuando la reacción se completa, los componentes no reactivos se remueven, por ejemplo, por
15 lavado, y los complejos anclados en la superficie sólida se detectan. Cuando el componente originalmente no inmovilizado porta una etiqueta detectable, la detección de la etiqueta inmovilizada en la superficie indica que la formación de complejo se presenta. Donde el componente originalmente no
20 inmovilizado no porta una etiqueta, el complejo puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo etiquetado específicamente enlazado al complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato interactúa con, pero no se enlaza a, una proteína particular codificada por el gen
25 identificado en la presente, su interacción con tal proteína

puede evaluarse por métodos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Tales ensayos incluyen enfoques tradicionales, tales como, reticulado, co-inmunoprecipitación, y co-purificación a través de gradientes
5 o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden monitorearse usando un sistema genético basado en levadura descrito por Fields y colaboradores [Fields and Song, *Nature (London)*, 340, 245-246 (1989); Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9578-
10 9582 (1991)] como se describe por Chevray and Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como levadura GAL4, consisten de dos dominios modulares físicamente discretos, uno actúa como el dominio de enlace al ADN, mientras que el
15 otro funciona como el dominio de activación de transcripción. El sistema de expresión de levadura descrito en las publicaciones anteriores (generalmente referido como el "sistema de dos híbridos") toma ventaja de esta propiedad, y emplea dos proteínas híbridas, una en la cual la proteína
20 objeto se fusiona al dominio de enlace al ADN de GAL4, y la otra, en la cual las proteínas que activan el candidato se fusionan al dominio de activación. La expresión del gen reportero GAL1-lacZ bajo control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de actividad GAL4 por medio
25 de interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen

polipéptidos que interactúan se detectan con substrato cromogénico para β -galactosidasa. Un kit completo (MATCHMAKERTM) para identificar las interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica de
5 dos híbridos está comercialmente disponible de Clontech. Este sistema también puede extenderse para mapear dominios de proteína involucrados en interacciones de proteína específicas así como a residuos de aminoácido puntiformes que son cruciales para estas interacciones.

10 Con objeto de encontrar compuestos que interfieran con la interacción de un gen identificado en la presente y otros componentes intra- o extracelulares pueden probarse, una mezcla de reacción se prepara usualmente que contiene el producto del gen y el componente intra- o extracelular bajo
15 condiciones y durante un tiempo que permite la interacción y enlace de los dos productos. Para probar la capacidad del compuesto de prueba para inhibir el enlace, la reacción se corre en ausencia y en presencia del compuesto de prueba. Además, el placebo puede agregarse a una tercera mezcla de
20 reacción, para servir como control positivo. El enlace (formación de complejo) entre el compuesto de prueba y el componente intra- o extracelular presente en la mezcla se monitorea como se describe arriba. la formación de un complejo en las reacciones de control pero no en la mezcla de
25 reacción que contiene el compuesto de prueba, indica que el

compuesto de prueba interfiere con la interacción del compuesto de prueba y su compañero de reacción.

L. Composiciones y Métodos para el Tratamiento de
5 Enfermedades Relacionadas con lo Inmune

Las composiciones útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con lo inmune incluye, sin limitación, proteínas, anticuerpos, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas antisentido y
10 ribozima, moléculas de hélice triple, etc., que inhiben o estimulan la función inmune, por ejemplo, proliferación/activación de células T, liberación de linfocina, o infiltración inmune.

Por ejemplo, las moléculas de ARN y ARN antisentido
15 actúan para bloquear directamente la traducción del mRNA al hibridizar el mRNA dirigido y prevenir la traducción de proteína. Cuando se usa el ADN antisentido, los oligodesoxiribonucleótidos derivados del sitio de inicio de traducción, por ejemplo, entre alrededor de-10 y +10
20 posiciones de la secuencia de nucleótido de gen objetivo, se prefieren.

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar el desdoblamiento específico de ARN. Las ribozimas actúan por hibridización específica de secuencia al
25 ARN objeto complementario, seguido por desdoblamiento

endonucleolítico. Los sitios de desdoblamiento de ribozima
específicos dentro de un ARN dirigido potencial pueden
identificarse por técnicas conocidas. Para mayores detalles
ver, por ejemplo, Rossi, Current Biology, 4, 469-471 (1994),
5 y publicación PCT No. WO 97/33551 (publicada el 18 de
Septiembre 1997).

Las moléculas de ácido nucleico en formación de hélice
triple usadas para inhibir la transcripción deberán ser de
hebra sencilla y estar compuestas de desoxinucleótidos. La
10 composición base de estos oligonucleótidos se diseña de tal
manera que promueve la formación de hélice triple por medio
de reglas de formación de pares base Hoogsteen, que
generalmente requieren alargamiento por tamaño de purinas o
pirimidinas en una hebra o dúplex. Para mayor detalles, ver,
15 por ejemplo, publicación PCT No. WO 97/33551, *supra*.

Estas moléculas pueden identificarse por cualesquiera o
cualquier combinación de los ensayos de separación por
exclusión discutidos arriba y/o por cualesquiera de otras
técnicas de separación por exclusión bien conocidos por
20 aquellos de habilidad en el arte.

M. Anticuerpos Anti-IL-17A/F

En una realización, la presente invención proporciona
anticuerpos anti-IL-17A/F que pueden encontrar uso en la
25 presente como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico. Los

anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos, y heteroconjugados.

1. Anticuerpos Policlonales

Los anticuerpos policlonales se producen preferiblemente
5 en animales por inyecciones subcutáneas múltiples (sc) o intraperitoneales (ip) de antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante (especialmente cuando se usan péptidos sintéticos) a una proteína que es inmunogénica en especies a inmunizarse. Por ejemplo, el
10 antígeno puede conjugarse a hemocianina de variedad de lapa (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina de bovino, o inhibidor de tripsina de frijol de soya, usando un agente derivador o bifuncional, por ejemplo, éster de maleimidobenzoilo succinimida (conjugación a través de
15 residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados al combinar, por ejemplo, 100 μg o
20 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y se inyecta la solución intradermalmente en sitios múltiples. Un mes después, los animales se estimulan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en
25 adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en

sitios múltiples. Siete a 14 días después, los animales se hacen sangrar y el suero se evalúa para concentración de anticuerpo. Los animales se estimulan hasta el plano de concentración. Los conjugados también pueden hacerse en
5 cultivo celular recombinante como fusiones de proteína. También los agentes de agregado tales como alúmina se usan apropiadamente para aumentar la respuesta inmune.

2. Anticuerpos Monoclonales

10 Los anticuerpos monoclonales pueden hacerse usando el método de hibridoma descrito primero por Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), o pueden hacerse por métodos de ADN recombinante (Patente E.U.A. No. 4,816,567).

En el método de hibridoma, un ratón u otro animal
15 hospedero apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se describe arriba para producir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se enlazan específicamente a la proteína usada para inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse in vitro.
20 Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y luego se fusionan con una línea de célula de mieloma usando un agente de fusión apropiado, tal como polietilen glicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic
25 Press, 1986)).

Las células de hibridoma de esta manera preparadas se siembran y hacen crecer en un medio de cultivo apropiada cuyo medio contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma precursoras, no fusionadas (también referidas como
5 compañeros de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para las hibridomas típicamente incluyen
10 hipoxantinas, aminopterina, y timidina (medio HAT), cuyas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma de compañero de fusión preferidas son aquellos que se fusionan eficientemente, producción de
15 alto nivel estable al soporte de anticuerpo por células que producen anticuerpos seleccionadas, y son sensibles al medio selectivo que selecciona contra las células precursoras no fusionadas. Las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma de murino, tales como aquellas derivadas de
20 tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponible del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y SP-2 y derivados por ejemplo, células X63-Ag8-653 disponibles del American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA. Las líneas de célula de heteromieloma de
25 ratón-humano y de mieloma humano se han descrito para la

producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); y Brodeur et al., Monoclonal Antibodies Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

5 El medio de cultivo en que las células de hibridoma crecen se evalúa para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, el enlace de especificidad de anticuerpos monoclonales producidos por células se determina por inmunoprecipitación o
10 por ensayo de enlace *in vitro*, tales como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA).

La afinidad de enlace del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse por el análisis Scatchard descrito en Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

15 Una vez las células de hibridoma que producen los anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada se identifican, los clones se pueden subclonar por procedimientos de dilución limitantes y hacerse crecer por métodos estándares (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles
20 and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo apropiados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden hacerse crecer *in vivo* como tumores ascitos en un animal por ejemplo, por inyección i.p. de las células
25 en ratones.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones son separados apropiadamente de los medios de cultivos, fluidos de ascitos, o suero por procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por
5 ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, usando proteína A o sefarosa-proteína G) o cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se
10 aísla y procesa en secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, al usar sondas de oligonucleótido que son capaces de enlazarse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de murino). Las células de hibridoma sirven como
15 una fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, los cuales son luego transfectados en células hospederas tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster Chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no
20 producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospederas recombinantes. Los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo incluye Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262
25 (1993) y Plückerthun, Immunol. Revs. 130:151-188 (1992).

En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las colecciones de fago de anticuerpo generadas usando las técnicas descritas en McCafferty et al., Nature, 348:552-554
5 (1990). Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos de murino y humano, respectivamente, usando colecciones de fago. Las publicaciones posteriores describen la producción de
10 anticuerpos humanos de alta afinidad (rango nM) por combinado de cadenas (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), así como infección de combinación y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir colecciones de fago muy grandes (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266
15 (1993)). Así, estas técnicas son alternativas viables a técnicas de hidridoma monoclonal de anticuerpo tradicional para aislar de anticuerpos monoclonales.

El ADN que codifica el anticuerpo se puede modificar para producir polipéptidos de anticuerpos de fusión o
20 quiméricos, por ejemplo, al sustituir secuencias de dominio constante de cadena pesada y cadena ligera (C_H y C_L) para las secuencias de murino homólogas (Patente E.U.A. No. 4,816,567; y Morrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), o por la fusión de la secuencia de codificación de
25 inmunoglobulina con todo o parte de la secuencia codificada

para un polipéptido sin inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). La secuencia de polipéptido sin inmunoglobulina puede substituirse por los dominios constantes de un anticuerpo, o se substituyen por los dominios de variantes de un sitio que combina el antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio que combina el antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio que combina el antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

10

3. Anticuerpos Humanos y Humanizados

El anticuerpo anti-IL-17A/F de la invención puede comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias enlazadas al antígeno de anticuerpos) las cuales contienen secuencias mínimas derivadas de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los cuales los residuos de una región determinada complementaria (CDR) del receptor son reemplazados por residuos de un CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tales como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En

algunos casos, los residuos de estructura Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos los cuales ni se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el CDR importado o secuencias de estructura. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá substancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios de variable, en los cuales todas o substancialmente todas las regiones CDR correspondientes a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o substancialmente todas las regiones FR, son aquellos de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de forma óptima también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente que de una inmunoglobulina humana [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

Los métodos para anticuerpos no humanos humanizados son bien conocidos en el arte. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en desde una superficie en la cual no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo son referidos como residuos "importantes", los cuales se toman típicamente desde un dominio variable "importante". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo el

método de Winter and co-workers [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)], por sustituir los roedores CDR o secuencia CDR para las
5 secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados son anticuerpos quiméricos (Patente E.U.A. No. 4,816,567), en donde substancialmente menos de un dominio variable humano intacto se substituyen por la secuencia correspondiente de una
10 especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los cuales los residuos de CDR y posiblemente los residuos de algo de FR son substituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

15 La elección de dominios variables humanos, ambos ligeros y pesados puede usarse en hacer los anticuerpos humanizados muy importantes para reducir la antigenicidad y respuesta al HAMA (anticuerpo anti-ratón humano) cuando el anticuerpo se intenta para el uso terapéutico humano. En consecuencia el
20 llamado método de "mejor colocación", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se separar por exclusión contra la colección completa de las secuencias de dominio variable humano conocido. La secuencia de dominio V humano la cual es más cercana a la del roedor identificada y
25 la región de estructura humana (FR) dentro de esta se acepta

para el anticuerpo humanizado (Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Otros usos del método para la región de estructura particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma estructura puede usarse para diversos anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)).

Es además importante que los anticuerpos humanizados con retención de afinidad de enlace alta para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para llevar a cabo esta meta, de conformidad a un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan por un proceso de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales son comúnmente disponibles y son familiares para aquellos de habilidad en el arte. Los programas de computadora son disponibles los cuales ilustran y exhiben probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estos despliegues permite el análisis del papel similar de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata,

esto es, el análisis de los residuos que influye en la habilidad de la inmunoglobulina candidata que se enlaza a su antígeno. De esta manera, los residuos FR pueden seleccionarse y combinarse de las secuencias recipientes e importantes de manera que la característica del anticuerpo deseada, tal como el incremento de afinidad para los antígenos objetivos se alcanza. En general, los residuos de la región hipervariable se dirigen y más substancialmente se involucran en el enlace del antígeno influenciado.

Las diversas formas de un anticuerpo anti-IL-17A/F humanizado se contemplan. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento del anticuerpo, tal como un Fab, el cual es conjugado opcionalmente con uno o más agentes de citotoxicidad con objeto de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

Como una alternativa para la humanización, los anticuerpos humanos pueden generarse. Por ejemplo, esto es posibles ahora para producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, durante la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en la ausencia de la producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, esto se describe que la eliminación homocigoto del gen de región de unión de cadena pesada del anticuerpo (J_H) en resultados de ratones mutantes quiméricos y línea

reproductora en la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la configuración del gen de inmunoglobulina de la línea reproductora humana en tales ratones mutantes de línea reproductora la cual resulta
5 en la producción de anticuerpos humanos durante el intercambio de antígenos. Ver, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno. 7:33 (1993); patente de E.U.A. Nos. 5,545,806,
10 5,569,825, 5,591,669 (todas de GenPharm); 5,545,807; y WO 97/17852.

Alternativamente, la tecnología de despliegue de fagos (McCafferty et al., Nature 348:552-553 [1990]) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos
15 in Vitro, de las propiedades del gen de dominio (V) variable de inmunoglobulina de donadores no inmunizados. En consecuencia a esta técnica, los genes de dominio V del anticuerpo se clonan en la forma ya sea un gen de proteína de recubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentosos, tal
20 como M13 o fd, y exhiben como fragmentos del anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpos también resultan en la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe estas propiedades. Así,
25 algunos de los fagos imitan algunas de las propiedades de la

célula B. El fago exhibido puede llevarse a cabo en una
variedad de formatos, revisadas en, por ejemplo, Johnson,
Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in
Structural Biology 3:564-571 (1993). Diversas fuentes de los
5 segmentos del gen V pueden usarse para exhibir el fago.
Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) aísla una
configuración diversas de anticuerpos anti-oxazolona de una
colección combinatoria aleatoria pequeña de los genes V
derivados de bazos de ratones inmunizados. Un repertorio de
10 genes V de donadores humano no inmunizados pueden construirse
y los anticuerpos para una configuración de antígenos
(incluyendo los mismo antígenos) pueden aislarse
esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks et
al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), o Griffith et al.,
15 EMBO J. 12:725-734 (1993). Ver también, patente de E.U.A.
Nos. 5,565,332 y 5,573,905.

Como se discute arriba, los anticuerpos humanos pueden
también generarse por células B activadas in Vitro (ver,
patentes de E.U.A. 5,567,610 y 5,229,275).

20

4. Fragmentos de anticuerpos

En ciertas circunstancias hay ventajas para usar
fragmentos del anticuerpo, en vez de anticuerpos completos.
25 El tamaño más pequeño de los fragmentos permite una

depuración rápida y puede llevar a un acceso mejorado a tumores sólidos.

Diversas técnicas se han desarrollado para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivan por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); and Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden ahora producirse directamente por células hospederas recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv puede todos expresarse en y secretarse de *E. coli*, así se permite la facilidad de producción de cantidades grandes de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de las colecciones de fago del anticuerpo discutidas arriba. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden recubrirse directamente de *E. coli* y químicamente acoplarse para formar los fragmentos $F(ab')_2$ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De conformidad a otro enfoque, los fragmentos $F(ab')_2$ pueden aislarse directamente de cultivo de célula hospedera recombinante. El fragmento Fab y $F(ab')_2$ con incremento de la vida media in vivo que comprende los residuos de epítipo de enlace del receptor de rescate se describe en la patente de E.U.A. No. 5,869,046. Otras técnicas para la producción de los fragmentos de

anticuerpos deberán ser aparentes por el practicante habilitado. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scfv). Ver WO 93/16185; patente de E.U.A. No. 5,571,894; y patente de E.U.A. No. 5,587,458. Fv y sFv son la especie solamente con sitios de combinación intactos que se desarrollan de regiones constantes; así, estas son adecuadas para la reducción de enlace no específicos durante el uso in vivo. Las proteínas de fusión sFv pueden construirse para producir la función de una proteína efectora en ya sea la terminal amino o carboxi de un sFv. Ver Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, supra. El fragmento de anticuerpos puede también ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de E.U.A. 5,641,870 por ejemplo. Tales fragmentos del anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

5. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de enlace por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden enlazarse a dos epítopos diferentes de una proteína IL-17A/F como se describe en la presente. Otros anticuerpos pueden combinar un sitio de enlace UL-17A/F con un sitio de enlace por otra proteína. Alternativamente, un brazo anti-IL-17A/F

puede combinarse con un brazo el cual enlaza a una molécula que dispara un leucocito tal como una molécula del receptor de célula T (por ejemplo, CD3) o receptor Fc para IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), de
5 manera que el mecanismo de defensa celular enfocado y localizado a la células expresa el IL-17A/F. los anticuerpos biespecíficos pueden también usarse para localizar agentes citotóxicos a las células las cuales expresan IL-17A/F. Estos anticuerpos poseen un brazo enlazado al IL-17A/F y un brazo
10 el cual se enlaza al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferon-α, vinca alcaloide, cadena de ricina A, metotrexato o isótopo de hapteno radioactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por
15 ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

La WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRIII y la patente de E.U.A. No. 5,837,234 describe un anticuerpos biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRI. Un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/Fcα es conocido en
20 WO98/02463. La patente de E.U.A. No. 5,821,337 enseña un anticuerpo anti-ErbB2/anti-CD3 biespecífico.

Los métodos para hacer anticuerpos biespecíficos son conocidos en el arte. La producción tradicional de
25 anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la

co-expresión de dos pares de cadena de ligera-pesada de inmunoglobulina, en donde dos cadenas que tienen diferentes especificidades (Millstein et al., Nature 305:537-539 (1983)). Debido a la clasificación aleatoria de cadenas
5 ligera y pesada de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpos, de los cuales solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, la cual es usualmente por las etapas de
10 cromatografía de afinidad, en vez de las incomodidades y los rendimientos del producto es bajo. Los procedimientos similares se describen en la WO 93/08829, y en Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991).

De conformidad a un enfoque diferente, los dominios
15 variable del anticuerpo con las especificidades de enlace deseadas (sitios combinados del antígeno-anticuerpo) se fusionan a las secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Preferiblemente, la fusión es con un dominio constante de cadena pesada Ig, que comprende al menos una
20 parte de la articulación, regiones C_H2, y C_H3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (C_H1) que contiene el sitio necesario para el enlace de cadena ligera, que presenta al menos una de las fusiones. El ADN que codifica la fusión de cadena pesada de inmunoglobulina y si
25 se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se inserta en

los vectores de expresión separados y se co-transfectan en una célula hospedera adecuada. Esto proporciona mayor flexibilidad en ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos del polipéptido en realizaciones cuando las relaciones desiguales de las tres cadenas del polipéptido se usan en la construcción proporcionando el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificadas para los dos o todas las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión sencillo cuando la expresión de al menos dos cadenas del polipéptido en relaciones iguales resulta en rendimientos altos o cuando las relaciones no tienen efecto importante en el rendimiento de la combinación de cadena deseada.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una especificidad de enlace primaria en un brazo, y un par de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina (proporcionando una segunda especificidad de enlace) en el otro brazo. Se encontró que su estructura asimétrica facilita la separación del compuestos biespecífico deseado de las combinaciones de la cadena de inmunoglobulina no buscada, como la presencia de una cadena de inmunoglobulina en solamente la mitad de la molécula biespecífica proporcionada para una manera de facilitar la separación. Este enfoque se describe en la WO 94/04690. Para

detalles adicionales de la generación de anticuerpos
bienespecíficos, ver Suresh et al., Methods in Enzymology
121:210 (1986).

De conformidad a otro enfoque descrito en la patente de
5 E.U.A. No. 5,731,168, la interfase entre un par de moléculas
de anticuerpo pueden producirse por ingeniería para maximizar
el porcentaje de heterodímeros los cuales se recuperan del
cultivo celular recombinante. La interfase preferida
comprende al menos una parte del dominio C_H3. Es este método,
10 una o más cadenas de aminoácido pequeñas de la interfase de
la molécula del anticuerpo primera se reemplaza con cadenas
laterales grandes (por ejemplo, tirosina o triptofano). Las
"cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar para
las cadenas laterales grandes se crean en la interfase de la
15 segunda molécula del anticuerpo por el reemplazo de cadenas
laterales de aminoácido con unas más pequeñas (por ejemplo,
alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para
incrementar el rendimiento del heterodímero durante otros
productos finales no buscado tal como homodímeros.

20 Los anticuerpos bienespecíficos incluyen anticuerpos de
ligadura cruzada o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de
los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse para la
avidina, el otro para la biotina. Tales anticuerpos, por
ejemplo, se han propuesto para dirigirse a las células del
25 sistema inmune a las células indeseables (Patente E.U.A. No.

4,676,980), y para el tratamiento de la infección por VIH(WO 91/00360, WO 92/200373, y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden hacerse usando cualquier método conveniente de ligadura cruzada. Los agentes de ligadura
5 cruzada adecuados son bien conocidos en el arte y se describe en la patente de E.U.A. No. 4,676,980, junto con un número de técnicas de ligadura cruzada.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos de los fragmentos de anticuerpos también se describen en la
10 literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando ligadura química. Brennan et al., Science 229:81 (1985) describe un procedimiento en donde los anticuerpos intactos se desdoblan proteolíticamente para generar los fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen
15 en la presencia del agente de formación de complejo, arsenita de sodio para estabilizar ditioles vecinales y prevenir la formación de disulfuro intramolecular. Los fragmentos Fab' generados luego se convierten a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab' -TNB luego se reconvierte
20 al Fab' -tiol por la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab' -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmunización selectiva de las enzimas.

Los progresos recientes han facilitado la recuperación directa de los segmentos Fab'-SH del *E. coli*, los cuales pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225
5 (1992) describe la producción de la molécula F(ab')₂ del anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secreta separadamente del *E. coli* y se sometió al acoplamiento químico dirigido in Vitro para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo
10 biespecífico así formado es capaz de enlazar a las células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como la actividad lítica que dispara linfocitos citotóxicos humanos contra objetivo de tumor de mama humana. Las técnicas diversas para hacer y aislar los
15 fragmentos del anticuerpo biespecífico dirigidos de cultivo de célula recombinante también se describen. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se producen usando cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de
20 leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazan a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión de gen. Los homodímeros del anticuerpos se reducen ala región finge para formar monómeros y luego se re-oxidizan para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este método puede
25 también utilizarse para la producción de homodímeros del

anticuerpo. La tecnología del "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) proporciona un mecanismo alternativo para hacer los fragmentos del anticuerpo biespecífico. Los fragmentos
5 comprenden un V_H conectado a un V_L por una ligadura la cual es muy corta para permitir la formación de pares entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios de complementariedad V_L y V_H de otro
10 fragmento, por ellos forman dos sitios de enlace al antígeno. Otra estrategia para hacer los fragmentos del anticuerpo biespecíficos para el uso de los dímeros de la cadena sencilla Fv (sFv) también se reportan. Ver Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

15 Los anticuerpos con más de dos valencias se contemplan. Por ejemplo, anticuerpos triespecíficos pueden prepararse. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

6. Anticuerpos heteroconjugados

20

Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos tienen, por ejemplo,
25 proporcionan células del sistema inmune objetivo a células no buscadas [Patente de E.U.A. 4,676,980] y para el tratamiento

de la infección de VIH [WO 91/00360; WO 92/2003737; EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos pueden prepararse in Vitro usando métodos conocidos en la química de la proteína sintética, incluyendo involucrar agentes de ligadura cruzada.

5 Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o por formar un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y aquellos descritos, por ejemplo, en la

10 patente de E.U.A. No. 4,676,980.

7. Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o

15 catabolizarse) más rápido que un anticuerpo divalente por una célula que expresa un antígeno en el cual el anticuerpo se enlaza. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (los cuales son diferentes de las clases IgM) con tres o más sitios de enlace al antígeno (por

20 ejemplo, anticuerpo tetravalentes), los cuales pueden producirse fácilmente por la expresión recombinante del ácido nucleico que codifica la cadenas del polipéptido del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de enlace del

25 antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste de) una región Fc o una región de articulación. En

este escenario, el anticuerpo deberá comprender una región Fc y tres o más sitios de enlace al antígeno de terminal amino en la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido en la presente comprende (o consiste de) tres o hasta alrededor de
5 ocho, pero preferiblemente cuatro, sitios de enlace al antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena de polipéptido (y preferiblemente dos cadenas de polipéptido), en donde las cadenas del polipéptido comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, las cadenas del
10 polipéptido pueden comprender $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, en donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptido de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido, y n es 0 ó 1. Por ejemplo, las cadenas del polipéptido pueden
15 comprender: cadena de región VH-CH1-Fc ligada al VH-CH1-flexible; o cadena de región VH-CH1-VH-CH1-Fc. El anticuerpo multivalente en la presente preferiblemente además comprende al menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente
20 en la presente puede, por ejemplo, comprender alrededor de dos hasta alrededor de ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en la presente comprenden un dominio variable de cadena ligera y opcionalmente, además comprenden
25 un dominio CL.

8. Ingeniería de la Función Efectora

Puede ser conveniente modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, a fin de aumentar la citotoxicidad mediada por la célula dependiente del antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede alcanzar al introducir una o más substituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, los residuos de cisteína se puede introducir en la región Fc, lo que permitira formación de enlace de disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una mejor capacidad de internalización y/o aumento de la eliminación celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Ver Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) and Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Los Anticuerpos homodiméricos con aumento de la actividad anti-tumor se pueden también preparar usando enlaces cruzados heterobifuncionales como se describe en Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, un anticuerpo puede ser de ingeniería la cual tiene regiones Fc dobles y puede por lo tanto tener mayor complemento de lisis y capacidades ADCC. Ver Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989). Para aumentar la vida media de suero del anticuerpo, se puede incorporar un receptor de salvamento

enlazado al epitopo en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describio en la patente de E.U.A. 5,739,277, por ejemplo. Como se usa en la presente, el término "receptor de salvamento enlazado al epitopo" se
5 refiere a un epitopo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, o IgG₄) que es responsable del aumento de la vida media de suero *in vivo* de la molécula IgG.

9. Inmunconjugados

10 La invención también se refiere a inmunconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimaticamente activa de bacterias, hongos, planta, u origen
15 animal, o fragmentos del mismo), o un isótopo radioactivo (esto es,, un radioconjugado).

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunconjugados se han descrito anteriormente. Las toxinas enzimaticamente activas y fragmentos del mismo que se
20 pueden usar incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos no enlazados de toxina de difteria, cadena exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena abrina A, cadena modicina A, alfa-sarcina, proteínas *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina,
25

crotina, inhibidor sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Una variedad de radionúclidos están disponibles para la producción de anticuerpos de radioconjugados. Los
5 ejemplos incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , y ^{186}Re . Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se hacen usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de
10 imidoésteres (tal como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tal como suberato de disucinimidilo), aldehídos (tal como glutareldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoilo) hexandiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos
15 (tal como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobencono). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar como se describió en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido
1-isotiocianatobencil-3-metildietilen
20 triaminapentaacético etiquetado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para conjugación de radionucleótido al anticuerpo. Ver WO94/11026.

Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tal como una caliqueamicina,
25 maitansinoides, un tricoteno, y CC1065, y los derivados de

estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan en la presente.

Maitansina y maitansinoides

5 En una realización preferida, un anticuerpo anti-IL-17A/F (longitud completa o fragmentos) de la invención se conjuga a una o más moléculas maitansinoide.

 Maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan al inhibir la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló
10 primero del arbusto de Africa oriental *Maytenus serrata* (Patente de E.U.A. No. 3,896,111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tal como maitansinol y ésteres C-3 maitansinol (Patente de E.U.A. No. 4,151,042). El maitansinol
15 sintético y derivados y análogos del mismo se describen, por ejemplo, en la patente de E.U.A. Nos. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866;
20 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; y 4,371,533, la descripción de la cual se incorpora en la presente como referencia.

Conjugados de anticuerpos maitansinoides

En un intento para mejorar su índice terapéutico, maitansina y maitansinoides se han conjugado a anticuerpos específicamente enlazados a antígenos celulares de tumor. Inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso
5 terapéutico se describe, por ejemplo, en las patentes de E.U.A. Nos. 5,208,020, 5,416,064 y Patente Europea EP 0 425 235 B1, las descripciones de las cuales quedan expresamente incorporados como referencia. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describe inmunoconjugados que
10 comprenden un maitansinoide designado DM1 enlazado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorectal humano. El conjugado se encontró altamente citotóxico hacia cultivos de células de cáncer de colon, y mostró actividad antitumor en un ensayo de crecimiento de
15 tumor *in vivo*. Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) describe inmunoconjugados en los cuales un maitansinoide se conjugó por medio de un ligador disulfuro al anticuerpo de murina A7 enlazado a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo
20 monoclonal de murina TA.1 que enlaza el oncogeno HER-2/*neu*. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se probó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa antígenos de superficie 3×10^5 HER-2 por célula. El conjugado de fármaco alcanzó un grado de citotoxicidad
25 similar al fármaco maitansinoide libre, el cual se podría

incrementar al aumentar el número de moléculas maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide muestra citotoxicidad sintémica baja en ratones.

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

Los conjugados de anticuerpo maitansinoide Anti-IL-17A/F se preparan al enlazar químicamente un anticuerpo anti-IL-17A/F a una molécula maitansinoide sin disminuir
10 significativamente la actividad biológica de ya sea el anticuerpo o la molécula maitansinoide. Un promedio de 3-4 conjugado de moléculas maitansinoide por moléculas de anticuerpo ha mostrado su eficacia en aumentar la citotoxicidad de células objetivo sin afectar negativamente
15 la función o solubilidad del anticuerpo, aunque aún una molécula de toxina/anticuerpo se espera que aumenten la citotoxicidad durante el uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y se pueden sintetizar por técnicas conocidas o aislar a partir de
20 fuentes naturales. Los maitansinoides adecuados se describen, por ejemplo, en patente de E.U.A. No. 5,208,020 y en las otras patentes y publicaciones no patentadas se refiere en este escrito. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos maitansinol modificados en el anillo aromático o en

otras posiciones de la molécula maitansinol, tal como diversos ésteres de matansinol.

Hay muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para hacer conjugados de anticuerpo maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, aquellos descritos en la patente de E.U.A. No. 5,208,020 o Patente EP 0 425 235 B1, y Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992). Los grupos enlazados incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos inestables al ácido, grupos fotoinestables, grupos inestables a la peptidasa, o grupos inestables a la esterasa, como se describe en las patentes identificadas anteriormente, los grupos disulfuro y tioéter son preferidos.

Los conjugados del anticuerpo y maitansinoide se pueden hacer usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tal como disuccinimidil suberato), aldehídos (tal como glutareldehído), compuestos bis-azido (tal como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de fluor bis activo (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Particularmente preferidos

los agentes de acoplamiento incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace de
5 bisulfuro.

La ligadura se puede colocar a la molécula maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlazador de éster se puede formar por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas convencionales de
10 acoplamiento. La reacción puede presentarse en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlazador se forma en la
15 posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

Caliqueamicina

Otros inmunoconjugados de interés comprenden un conjugado de anticuerpo anti-IL-17A/F a una o más moléculas
20 de caliqueamicina. La familia de caliqueamicina de antibióticos son capaces de producir bloqueadores ADN de hebra doble en concentraciones sub-picomolar. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, ver patentes de E.U.A 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116,
25 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (todos

a American Cyanamid Company) Los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-acetil- γ_1^I , PSAG y θ_1^I (Hincan et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las antes mencionadas patentes de E.U.A a American Cyanamid). Otros fármacos anti-tumor que el anticuerpo puede conjugar es QFA que es un antifolato. Ambos caliqueamicina y QFA tienen sitios intracelulares de acción y no cruza fácilmente la membrana de plasma. Por lo tanto, la absorción celular de estos agentes a través de la internalización mediada por el anticuerpo aumenta sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumor que se pueden conjugar a los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente complejo LL-E33288 descritos en patentes de E.U.A. 5,053,394, 5,770,710, así como esperamicinas (patente de E.U.A. 5,877,296).

Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen cadena difteria A, fragmentos activos no enlazados de toxina de difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina

A, cadena de abrina A, cadena de modicina A, salfa-sarcina, proteínas *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor sapaonaria
5 officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricótesenos. Ver, por ejemplo, WO 93/21232 publicada el 28 de Octubre 1993.

La presente invención además contempla un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto
10 con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa ADN tal como una deoxiribonucleasa; DNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Una variedad de isótopos radioactivos son disponibles para la producción
15 de anticuerpos anti-IL-17A/F radioconjugados. Los ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando el conjugado se usa para diagnosis, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , o una etiqueta de
20 giro por formación de imagen de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocido como formación de imagen de resonancia magnética nuclear, (RMN), tal como yodo-123 nuevamente, yodo 131, indio 111, fluoro 19, carbono 13, nitrógeno 15, oxígeno 17, gadolinio, manganeso o hierro.

Las radioetiquetas u otras etiquetas se pueden incorporar en el conjugado en medios conocidos. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar por síntesis de aminoácido química usando precursores de aminoácido adecuados que implican, por ejemplo, flúor 19 en lugar de hidrógeno. Las etiquetas tal como $\text{tc}^{99\text{m}}$ ó I^{123} , Re^{186} , Re^{188} y In^{111} se puede enlazar por medio de un residuo de cisterna en el péptido. El itrio 90 se puede enlazar por medio residuo de lisina. El método IODOGEN (Franker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Común. 80: 49-57 se puede usar para incorporar yodo 123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

Los conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se pueden hacer usando una variedad de proteína bifuncional acoplando a agentes tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como suberato disuccinimidil), aldehídos (tales como glutareldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolieno 2,6-diisocianato), y compuestos de fluoruro bis-activos (tales

como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una ricin
inmunotoxina se puede preparar como se describe en Vitetta et
al., Science 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-
3-metildietileno triaminopentaacético etiquetado con Carbono
5 14-(MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para la
conjugación de radionucleótido al anticuerpo. Ver W094/11026.
La ligadura puede ser un "ligadura de desdoblamiento"
facilitando la liberación del fármaco citotóxico en la
célula. Por ejemplo, una ligadura inestable al ácido,
10 ligadura sensible a peptidasa, ligadura fotoinestable,
ligadura de dimetilo o ligadura que contiene disulfuro (Chari
et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); patente de E.U.A.
No. 5,208,020) se pueden usar.

Alternativamente, una proteína de fusión que comprende
15 el anticuerpo anti-IL-17A/F y el agente citotóxico se pueden
hacer, por ejemplo, por técnicas recombinantes o síntesis
péptidas. La longitud de ADN puede comprender regiones
respectivas que codifican las dos porciones del conjugado ya
sea adyacente u algún otro o separado por una región que
20 codifica un péptido ligado que no destruye las propiedades
deseadas del conjugado.

Todavía en otra realización, el anticuerpo puede ser
conjugado a un "receptor" (tal como estreptavidina) durante
la utilización en una pre-dirección de tumor en donde el
25 anticuerpo-receptor conjugado se administra al paciente,

seguido por la eliminación del conjugado no enlazado de la circulación usando un agente limpiador y luego administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que es conjugado a un a agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

5

10. Inmunoliposomas

Los anticuerpos anti-IL-17A/F descritos en la presente pueden también ser formulados como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que son útiles útil
10 para entrega de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma son configurados comúnmente en una formación bicapa, similar a los lípidos configurados de membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por
15 métodos conocidos en el arte, tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); Pat. E.U. Nos. 4,485,045 y 4,544,545; y WO97/38731 publicada el 23 de Octubre, 1997. Los liposomas con tiempo de circulación
20 aumentado se describen en patente de E.U.A. No. 5,013,556.

Los liposomas particularmente útiles se pueden generar por el metodo de evaporación de fase inversa con una composición lipida que comprende fosfatidilcolina, colesterol
25 y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyeron a través de tamaño de poro definido

para proporcionar liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden ser conjugados a los liposomas como se describe en Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) por medio de una reacción de intercambio de disulfuro. Un agente quimioterapeutico es opcionalmente contenido sin el liposoma. Ver Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989).

10 N. Oligopéptidos enlazados IL-17A/F

Los oligopéptidos enlazados IL-17A/F de la presente invención son oligopéptidos que enlazan, preferiblemente específicamente, a un polipéptido IL-17A/F como se describe en la presente. Los oligopéptidos enlazados IL-17A/F pueden ser sintetizados químicamente usando conocida metodología de síntesis de oligopéptido o se puede preparar y purificar usando tecnología recombinante. Los oligopéptidos enlazados IL-17A/F son usualmente al menos alrededor de 5 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos alrededor de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98,

99, o 100 aminoácidos de longitud o más, en donde tales oligopéptidos que son capaz de enlazar, preferiblemente específicamente, a un polipéptido IL-17A/F como se describe en la presente. Los oligopéptidos enlazados IL-17A/F se
5 pueden identificar sin experimentación indebida al usar técnicas bien conocidas. En este texto, se nota que las técnicas para la colección de oligopéptido de separación por exclusión para oligopéptidos que son capaces de enlazar específicamente a un polipéptido dirigido son bien conocidas
10 en el arte (ver, por ejemplo, patente de E.U.A. Nos. 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; Publicación PCT Nos. WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad.
15 Sci. E.U.A., 82:178-182 (1985); Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 87:6378; Lowman, H.B. et al.
20 (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 88:8363, y Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668).

A este respecto, un despliegue bacteriofago (fago) es una técnica bien conocida la cual permite una gran selección de colecciones de oligopéptido para identificar miembros de aquellas colecciones que son capaces de enlazar específicamente a un polipéptido dirigido. El despliegue fago es una técnica por la cual las variantes de polipéptidos son desplegados como proteínas de fusión a la capa de proteína en la superficie de partículas de bacteriofago (Scott, J.K. and Smith, G. P. (1990) Science 249: 386). La utilidad del despliegue de fago reside en el hecho que las colecciones grandes de variantes de proteínas selectivamente aleatorias (o cADNs clonados aleatoriamente) pueden ser ordenadas rápidamente y eficazmente para aquellas secuencias que enlazan la molécula dirigida con alta afinidad. El despliegue de péptido (Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378) o colección de proteína (Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363) en fago se han usado para millones de separaciones por exclusión de polipéptidos o oligopéptidos para unos con propiedades de enlace específico (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668). La clasificación de colecciones de fago de mutantes aleatorios requiere una estrategia para construir y propagar un gran numero de variantes, un

procedimiento para purificación de afinidad usando el receptor dirigido, y un medio para evaluar los resultados del enriquecimiento del enlace. La patente de E.U.A. Nos. 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, y 5,663,143.

5 Aunque los mayores métodos de despliegue de fago tiene uso de filamentos de fago, sistemas de despliegue de lambdaide (WO 95/34683; E.U. 5,627,024), sistemas de despliegue de fago T4 (Ren, Z-J. et al. (1998) Gene 215:439; Zhu, Z. (1997) CAN 33:534; Jiang, J. et al. (1997) can 128:44380; Ren, Z-J. et
10 al. (1997) CAN 127:215644; Ren, Z-J. (1996) Proteína Sci. 5:1833; Efimov, V. P. et al. (1995) Virus Genes 10:173) y sistemas despliegue de fago T7 (Smith, G. P. and Scott, J.K. (1993) Methods in Enzymology, 217, 228-257; U.S. 5,766,905) también son conocidos.

15 Muchas otras mejoras y variaciones del concepto de despliegue básico actualmente se han desarrollado. Estos Estas mejoras aumentan la capacidad de sistemas de despliegue para colecciones de péptido de separación por exclusión para enlazar las moléculas dirigidas seleccionadas y para
20 proteínas funcionales de despliegue con el potencial de separación por exclusión estas proteínas para las propiedades deseadas. La reacción combinada de los dispositivos para reacciones de despliegue de fago se han descubierto (WO 98/14277) y colecciones de despliegue de fago se han usado
25 para analizar y controlar interacciones biomoleculares (WO

98/20169; WO 98/20159) y propiedades de los péptidos helicoidal limitado (WO 98/20036). El WO 97/35196 describe un método de aislamiento de un ligando de afinidad en el cual una colección de despliegue de fago se contacta con una
5 solución en el cual el ligando será enlazada a una molécula dirigida y una solución en la cual el ligando de afinidad no será enlazada a la molécula dirigida, para aislar selectivamente ligandos enlazados. El WO 97/46251 describe un método de colección de despliegue de fago aleatoria de con un
10 anticuerpo purificado de afinidad y luego fago de enlace aislado, seguido por un proceso microinmuneplaqueteo usando pozos de microplato para aislar fago de enlace de alta afinidad. El uso de proteína A *Staphylococcus aureus* como una etiqueta de afinidad también se ha reportado (Li et al.
15 (1998) Mol Biotech., 9:187). El WO 97/47314 describe el uso de colecciones de substracción de substrato para distinguir especificidades de encimas usando una colección combinatoria la cual puede ser una colección de despliegue de fago. Un método para seleccionar encimas apropiadas para usar en
20 detergentes usando despliegue de fago se describe en WO 97/09446. Los métodos adicionales de selección de proteínas de enlace específico se describen en la patente de E.U.A. Nos. 5,498,538, 5,432,018, y WO 98/15833.

Los métodos de generación de colecciones de péptido y la
25 separación por exclusión de aquellas colecciones son también

descritas en la patente de E.U.A. Nos. 5,723,286, 5,432,018, 5,580,717, 5,427,908, 5,498,530, 5,770,434, 5,734,018, 5,698,426, 5,763,192, y 5,723,323.

5 O. Moléculas Orgánicas de enlace IL-17A/F

Las moléculas orgánicas de enlace IL-17A/F son moléculas orgánicas con la condición de que los oligopéptidos o anticuerpos son como se definen en la presente que enlazan, preferiblemente específicamente, a un polipéptido IL-17A/F
10 como se describe en la presente. Las moléculas orgánicas de enlace IL-17A/F se pueden identificar y sintetizar químicamente usando metodología conocida (ver, por ejemplo, Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas de enlace IL-17A/F son usualmente menos que
15 alrededor de 2000 daltones en tamaño, alternativamente menos que alrededor de 1500, 750, 500, 250 o 200 daltones en tamaño, en donde tales moléculas orgánicas que son capaces de enlazar, específicamente preferiblemente, a un polipéptido IL-17A/F como se describe en la presente se pueden
20 identificar sin experimentación indebida al usar técnicas bien conocidas. A este respecto, se nota que las técnicas para colecciones de moléculas orgánicas de separación por exclusión que son capaces de enlazar a un polipéptido dirigido son bien conocidas en el arte (ver, por ejemplo,
25 Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas

orgánicas de enlace IL-17A/F pueden ser, por ejemplo, aldehídos, cetonas, oximas, hidrazonas, semicarbazonos, carbazidos, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, N-hidrazinas substituidas, hidrazidas, alcoholes, éteres, tioles, tioéteres, disulfuros, ácidos carboxilícos, ésteres, amidas, ureas, carbamatos, carbonates, cetales, tiocetales, acetales, tioacetales, haluros de arilo, sulfonato de arilo, haluros de alquilo, sulfonatos alquilo, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, anilinos, alquenos, alquinos, dioles, amino alcoholes, oxazolidines, oxazolinas, tiazolidinas, tiazolinas, enaminas, sulfonamidas, epoxidos, aziridinas, isocianatos, cloruros de sulfonil, compuestos diazo, ácidos cloruros, o los similares.

15 P. Separación por Exclusión para los Anticuerpos Anti-IL-17A/F, Oligopéptidos que enlazan IL-17A/F y Moléculas Orgánicas que enlazan IL-17A/F con las Propiedades Deseadas.

Las técnicas para generar anticuerpos generadores, oligopéptidos y moléculas orgánicas que se enlazan a los polipéptidos IL-17A/F se han descrito anteriormente. Se pueden seleccionar anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas con ciertas características biológicas, como se desee.

25

Los efectos inhibitorios del crecimiento de un anticuerpo anti-IL-17A/F, oligopéptido u otra molécula

orgánica de la invención pueden ser evaluados mediante los métodos conocidos en el arte, por ejemplo, usando células que expresan un polipéptido IL-17A/F ya sea endógenamente o siguiendo la transfección siguiente con el gen IL-17A/F. Por ejemplo, las líneas celulares del tumor apropiado y las células transfectadas IL-17A/F pueden tratarse con un anticuerpo monoclonal anti-IL-17A/F, oligopéptido u otras moléculas orgánicas de la invención en diversas concentraciones durante unos días (por ejemplo, 2-7) días y teñidas con violeta de cristal o MTT o analizadas mediante algún otro ensayo colorimétrico. Otro método para medir la proliferación sería comparando la absorción o captación de 3H-timidina mediante las células tratadas en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-IL-17A/F, oligopéptido que enlaza IL-17A/F o molécula orgánica que enlaza IL-17A/F de la invención. Después del tratamiento, las células se cosechan y la cantidad de radioactividad incorporada en el ADN cuantificado en un contador de escintilación. Los controles positivos apropiados incluyen el tratamiento de una línea celular seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento conocido por inhibir el crecimiento de esa línea celular. La inhibición del crecimiento de células del tumor in vivo puede determinarse de varias maneras conocidas en el arte. Preferentemente, la célula del tumor es una que sobreexpresa un polipéptido IL-17A/F. Preferentemente, el

anticuerpo anti-IL-17A/F, oligopéptido que enlaza IL-17A/F o molécula orgánica que enlaza IL-17A/F inhibirán la proliferación celular de una célula del tumor Que expresa IL-17A/F in vitro o in vivo mediante aproximadamente 25-100% comparados a la célula de tumor de no tratada, más preferentemente, mediante aproximadamente 30-100%, y más aun preferentemente por aproximadamente 50-100% o 70-100%, en una realización, a una concentración del anticuerpo de aproximadamente 0.5 a 30 µg/ml. La inhibición del crecimiento puede medirse a una concentración del anticuerpo de aproximadamente 0.5 a 30 µg/ml o aproximadamente 0.5 nM a 200 nM en el cultivo de la célula, dónde la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células del tumor al anticuerpo. La inhibición del crecimiento se inhibe in vivo si la administración del anticuerpo anti-IL-17A/F desde aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal resulta en la reducción en el tamaño del tumor o reducción de la proliferación del tumor celular dentro de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferentemente dentro de aproximadamente 5 a 30 días.

Para seleccionar un anticuerpo anti-IL-17A/F, el oligopéptido que enlaza a IL-17A/F o molécula orgánica que

enlaza IL-17A/F, que induce la muerte celular, la pérdida de integridad de la membrana como se indica por ejemplo, mediante por ejemplo, yoduro de propidio (PI), azul de tripano o captación de 7AAD pueden evaluarse en relación al control. Un ensayo de captación de PI puede realizarse en ausencia del complemento y células efectoras inmunes. Las células del tumor que expresan al polipéptido IL-17A/F se incuban con el medio solo o con el medio que contiene el anticuerpo anti-IL-17A/F apropiado (por ejemplo, aproximadamente 10 µg/ml), oligopéptido que enlaza IL-17A/F o molécula orgánica que enlaza IL-17A/F. Las células se incuban durante un periodo de 3 días. Siguiendo cada tratamiento, las células se lavan y se reparten en tubos de 12 x 75 tapados con un cedazo (1ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la remoción de grupos celulares. Los tubos reciben entonces PI (10 µg/ml). Las muestras pueden analizarse usando un citómetro de flujo FACSCAN® y software FACSCONVERT® de CellQuest (Becton Dickinson). Aquéllos anticuerpos anti-IL-17A/F, oligopéptidos que enlazan IL-17A/F o moléculas orgánicas que enlazan IL-17A/F que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular determinados por la captación de PI pueden seleccionarse como anticuerpos anti-IL-17A/F que inducen la muerte celular,

oligopéptidos que enlazan IL-17A/F o moléculas orgánicas que enlazan IL-17A/F.

Para la separación por exclusión de los anticuerpos, los oligopéptidos u otras moléculas orgánicas que enlazan a un epítopo o a un polipéptido IL-17A/F ligado mediante un anticuerpo de interés, puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado tal como se describe en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988. Este ensayo puede usarse para determinar si un anticuerpo de prueba, oligopéptido u otra molécula orgánica enlaza al mismo sitio o epítopo como un anticuerpo anti-IL-17A/F conocido. Alternativamente, o adicionalmente, el mapeo del epítopo puede ser realizado mediante métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, la secuencia del anticuerpo puede ser mutagenizada tal como por escaneo de alanina, para identificar los residuos del contacto. El anticuerpo mutante se prueba inicialmente para enlazarse con el anticuerpo policlonal para asegurar el plegado apropiado. En un método diferente, los péptidos que corresponde a regiones diferentes de un polipéptido IL-17A/F pueden usarse en ensayos de competición con los anticuerpos de prueba o con un anticuerpo de prueba y un anticuerpo con un epítopo conocido o caracterizado.

Q. Composiciones farmacéuticas

Las moléculas activas IL-17A/F de la invención (por ejemplo, polipéptidos IL-17A/F, anticuerpos anti-IL-17A/F y/o variantes de cada uno) así como otras moléculas identificadas mediante ensayos de separación por exclusión descritos
5 arriba, pueden administrarse para el tratamiento de enfermedades relacionadas con lo inmune, en la forma de composiciones farmacéuticas.

Las formulaciones terapéuticas de la molécula activa IL-17A/F, preferentemente un polipéptido o anticuerpo de la
10 invención, se prepara para el almacenamiento mezclando la molécula activa que tiene el grado deseado de pureza con portadores opcionales farmacéuticamente aceptables, excipientes o estabilizadores (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a. edición, Osol, A. Ed. [1980]), en la forma de
15 formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores aceptables, excipientes, o estabilizadores son no tóxicos para recipientes en dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que
20 incluyen ácido ascórbico y metionina; conservadores (como el cloruro amónico de octadecildimetilbencilo; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol bencílico o butílico; parabenos de alquilo tales como paraben metilo o propilo; catecol; resorcinol;

ciclohexanol; 3-pentanol; y m-metilfenolo); polipéptidos de peso molecular bajo (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones que forman sales tales como la del sodio, complejos metálicos (por ejemplo, complejos de la proteína Zn); y/o tensoactivos no iónico tales como TWEENTM, PLURONICSTM o glicol de polietileno (PEG).

Pueden formularse compuestos identificados mediante ensayos de separación por exclusión descritos en la presente de una manera análoga, usando técnicas estándar bien conocidas en el arte.

También pueden usarse Lipofecciones o liposomas para suministrar la molécula IL-17A/F en las células. Cuando se usan fragmentos del anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se enlaza específicamente al dominio de enlace de la proteína objetivo. Por ejemplo, en base a las secuencias de la región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse las moléculas del péptido que retienen la capacidad de enlazar la secuencia de la proteína objetivo.

Tales péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o pueden producirse mediante tecnología de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893 [1993]).

5

La formulación en la presente puede contener también más de un compuesto activo como sea necesario para la indicación particular a tratarse, preferentemente aquéllos con actividades complementarias que no nos afectan adversamente entre si. Alternativamente, o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, citoquina o crecimiento del agente inhibidor. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito proyectado.

15 Las moléculas activas IL-17A/F también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de suministro del fármaco coloidales (por ejemplo, 20 liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

25 Las formulaciones a ser usadas para la administración in vivo deben ser estériles. Esto es fácilmente de llevar a cabo

mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida o moléculas de IL-17A/F. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en la forma de artículos formados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidos (Pat americana. No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, acetato de etilen vinilo no degradable, copolímeros de ácido glicólico láctico degradables como LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas del copolímero de ácido glicólico láctico y acetato de leuprolido), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como el acetato de etilen vinilo y el ácido-láctico ácido-glicólico permiten la liberación de moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante lapsos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen durante mucho tiempo en el cuerpo, pueden desnaturalizarse o pueden agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, resultando en

una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden inventarse estrategias racionales para la estabilización dependiente del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación se descubre la
5 formación del enlace S-S intermolecular a través del intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse modificando los residuos de sulfhidrilo, liofilización de soluciones ácidas, controlando el grado hidrométrico, usando aditivos apropiados, y desarrollando las
10 composiciones de matriz de polímero específicas.

R. Métodos de Tratamiento

Se contempla que pueden usarse los polipéptidos, anticuerpos y otros compuestos activos de la invención
15 presente para tratar varias enfermedades relacionadas con lo inmune y condiciones, tales como enfermedades mediadas por las células T, que incluyen aquéllas caracterizadas por la infiltración de células inflamatorias en un tejido, el estímulo de la proliferación de células T, inhibición de
20 proliferación de la célula T, incrementada o permeabilidad vascular disminuida o inhibición de las mismas.

Condiciones ejemplares o trastornos a ser tratados con los polipéptidos, anticuerpos y otros compuestos de la invención, incluyen, pero no se limitan a lupus sistémico
25 eritematoso, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil,

osteoartritis, spondiloartropatías, esclerosis sistémica (escleroderma), miopatía inflamatoria idiopática (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria nocturna paroxismal), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopenica idiopática, trombocitopenia mediada inmune), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrofica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada inmune (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades de desmielinización de los sistemas nerviosos centrales y periféricos como la esclerosis múltiple, polineuropatía de desmielinización idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía de desmielinización inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis activa crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y colangitis esclerotizante, enfermedad inflamatoria del intestino (colitis ulcerativa: enfermedad de Crohn), enteropatía sensible al gluten, y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel mediada inmune o autoinmune que incluyen enfermedades de piel bulosa, eritema multiforme y dermatitis por contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas

como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a la comida y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón tales como la pulmonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática e hipersensibilidad a la
5 neumonitis, trasplante asociado con las enfermedades que incluyen rechazo de injertos y enfermedad de huésped contra injerto.

En el lupus sistémico eritematoso, el mediador central de la enfermedad es la producción de anticuerpos auto-
10 reactivos a las mismas proteínas/tejidos y la generación subsiguiente de inflamación mediada inmune. Los anticuerpos median ya sea directamente o indirectamente el daño del tejido. Aunque no se ha demostrado que los linfocitos T estén involucrados directamente en el daño del tejido, se requieren
15 linfocitos T para el desarrollo de anticuerpos auto-reativos. La génesis de la enfermedad es por lo tanto, dependiente del linfocito T. Los órganos múltiples y sistemas están afectados clínicamente incluyendo el riñón, pulmón, sistema músculo-esquelético, mucocutáneo, ojo, sistema
20 nervioso central, sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal, médula ósea y sangre.

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad inflamatoria autoinmune sistémico crónica que principalmente
25 involucra la membrana sinovial de articulaciones múltiples con la lesión resultante al cartílago articular. La

patogénesis es el linfocito T dependiente y está asociado con la producción de factores reumatoides, auto-anticuerpos dirigidos contra el mismo IgG, con la formación resultante de complejos inmunes que logran niveles altos en los fluidos y sangre en conjunto. Estos complejos en conjunto pueden inducir el infiltrado marcado de linfocitos y monocitos en el sinovio y cambios subsiguientes sinoviales marcados; el espacio/fluido en conjunto si se infiltra mediante células similares con la adición de numerosos neutrófilos. Los tejidos afectados están principalmente en conjunto, a menudo en un patrón simétrico. Sin embargo, la enfermedad extra-articular también ocurre en dos principales formas. Una forma es el desarrollo de lesiones extra-articular con la enfermedad en conjunto progresiva continua y las lesiones típicas de fibrosis pulmonar, vasculitis, y úlceras cutáneas. La segunda forma de enfermedad extra-articular es el llamado síndrome de Felty que ocurre tarde en el curso de la enfermedad RA, algunas veces después de que la enfermedad en conjunto se ha vuelto inmóvil, e involucra la presencia de neutropenia, trombocitopenia y esplenomegalia. Esto puede acompañarse por vasculitis en órganos múltiples con formaciones de infartos, úlceras superficiales y gangrena. Los pacientes a menudo también desarrollan nódulos reumatoides en el tejido subcutáneo inferior del conjunto afectado; los nódulos de fase tardía tienen centros

necróticos rodeados por una célula inflamatoria mixta infiltrada. Otras manifestaciones que pueden ocurrir en RA incluyen: pericarditis, pleuritis, arteritis coronaria, neumonitis intersticial con fibrosis pulmonar,
5 queratoconjuntivitis sicca, y nódulos reumatoides.

La artritis crónica juvenil es una enfermedad inflamatoria idiopática crónica que inicia a menudo en menores de 16 años de edad. Su fenotipo tiene algunas similitudes con RA; algunos pacientes que tienen un factor
10 reumatoide positivo se clasifican como artritis reumatoide juvenil. La enfermedad se sub-clasifica en tres categorías principales: pauciarticular, poliarticular, y sistémica La artritis puede ser severa y puede ser típicamente destructiva y puede conducir a la anquilosis en conjunto y crecimiento
15 retardado. Otras manifestaciones pueden incluir uveítis anterior crónica y amiloidosis sistémica.

Las espondiloartropatías son un grupo de trastornos con algunas características clínicas comunes y asociación común con la expresión del producto del gen HLA-B27. Los trastornos
20 incluyen: espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter (artritis reactiva), artritis asociada con la enfermedad del intestino inflamatoria, espondilitis asociada con la soriasis, espondiloartropatía de ataque juvenil y espondiloartropatía no diferenciada. Las características de
25 distinción incluyen sacroileitis con o sin espondilitis;

artritis asimétrica inflamatoria; asociación con HLA-B27 (alelos definidos serológicamente del locus HLA-B de clase I MHC); inflamación ocular, y ausencia de autoanticuerpos asociados con otras enfermedades reumatoides. La célula más
5 implicada como clave para la inducción de la enfermedad es el linfocito CD8⁺ T, una célula que dirige el antígeno presentado por la clase de moléculas MHC I. Los linfocitos T CD8⁺ pueden reaccionar contra la clase HLA-B27 del alelo I MHC como si fuera que un péptido extranjero expresado por
10 moléculas clase I MHC. Se ha hecho un supuesto que un epítipo HLA-B27 puede imitar a un epítipo antigénico microbiano o bacterianos y por lo tanto, inducir una respuesta de las células CD8⁺ T.

La esclerosis sistémica (escleroderma) tiene una
15 etiología desconocida. Un sello de la enfermedad es la inflamación de la piel; probablemente esto es inducido por un proceso inflamatorio activo. La escleroderma puede ser localizada o sistémica; lesiones vasculares son comunes y el daño celular endotelial en la microvasculatura es un evento
20 prematuro e importante en el desarrollo de la esclerosis sistémica; la lesión vascular puede ser inmune mediada. Una base inmunológica es implícita por la presencia de infiltrados de células mononuclear en las lesiones cutáneas y la presencia de anticuerpos antinucleares en muchos
25 pacientes. El ICAM-1 es a menudo sobrerregulada en la

superficie celular de fibroblastos en lesiones de la piel que sugieren que la interacción del linfocito T con estas células puede tener un papel en la patogénesis de la enfermedad. Otros órganos involucrados incluyen: el tracto
5 gastrointestinal: atrofia del músculo liso y fibrosis que resultan en la peristalsis/motilidad anormal; riñón: proliferación íntima subendotelial concéntrica que afecta las arterias interlobulares y arcadas pequeñas con el flujo sanguíneo cortical renal reducido resultante, resulta en
10 proteinuria, azotemia e hipertensión; músculo esquelético: atrofia, fibrosis intersticial; inflamación; pulmón: neumonitis intersticial y fibrosis intersticial; y corazón: necrosis de banda de reducción, cicatrización/fibrosis.

Las miopatías inflamatorias idiopáticas incluyen
15 dermatomiositis, polimiositis y otros son trastornos de inflamación del músculo crónico de etiología desconocida que produce debilidad del músculo. La lesión/inflamación del músculo es a menudo simétrico y progresivo. Los autoanticuerpos están asociados con la mayoría de las formas.
20 Estos autoanticuerpos de miositis específica se dirigen contra e inhiben la función de los componentes, proteínas y ARNs, involucrados en la síntesis de la proteína.

El síndrome de Sjögren se debe a la inflamación inmune
25 mediada y la destrucción funcional subsiguiente de las glándulas lagrimales y glándulas salivales. La enfermedad

puede asociarse con o puede acompañarse mediante enfermedades del tejido conectivo inflamatorias. La enfermedad está asociada con la producción del autoanticuerpo contra Ro y antígenos La, ambos de los cuales son complejos pequeños del
5 ARN de la proteína. Las lesiones resultan en una queraconjuntivitis sicca, xerostomia, con otras manifestaciones o asociaciones que incluyen cirrosis biliar, periférica o neuropatía sensorial, y púrpura palpable.

La vasculitis sistémica es una enfermedad en la cual la
10 lesión primaria es un daño subsiguiente e inflamación para los vasos sanguíneos que resultan en una isquemia/necrosis/degeneración de tejidos proporcionados por los vasos afectados y trastorno del órgano final eventual en algunos casos. Las vascularizaciones también pueden ocurrir
15 como una lesión secundaria o secuela a otras enfermedades mediadas por una inflamación inmune tales como la artritis reumatoide, esclerosis sistémica, etc., particularmente en enfermedades también asociadas con la formación de complejos inmunes. Las enfermedades en el grupo vasculitis sistémico
20 primario incluyen: vasculitis de necrotización sistémica: poliarteritis nodosa, angiitis alérgica y granulomatosis, poliangiitis; granulomatosis de Wegener; granulomatosis limfomatoide; y arteritis celular gigante. Las vasculitis misceláneas incluyen: síndrome del ganglio linfático
25 mucocutáneo (MLNS o enfermedad de Kawasaki), vasculitis CNS

aislada, enfermedad de Behet, tromboangitis obliterans (enfermedad de Buerger) y venulitis de necrotización cutánea. Se cree que el mecanismo patogénico de la mayoría de los tipos de vasculitis listados principal se debe a la deposición de complejos de inmunoglobulina en la pared del vaso y la inducción subsiguiente de una respuesta inflamatoria vía ADCC, activación del complemento, o ambos.

La sarcoidosis es una condición de etiología desconocida que se caracteriza por la presencia de granulomas epitelioides en casi cualquier tejido en el cuerpo; el envolvimiento del pulmón es muy común. La patogénesis involucra la persistencia de macrófagos activados y células linfoides en sitios de la enfermedad con la secuela crónica subsiguiente resultante de la liberación de los productos localmente y sistémicamente activos liberados por estos tipos celulares.

La anemia hemolítica autoinmune incluye anemia hemolítica autoinmune, pancitopenia inmune, y hemoglobinuria nocturnal paroxismal es un resultado de la producción de anticuerpos que reaccionan con los antígenos expresados en la superficie de las células sanguíneas rojas (y en algunos casos las células de otras células sanguíneas que incluyen plaquetas también) y es una reflexión de la remoción de aquéllos anticuerpos cubiertos de células vía el complemento

de lisis mediado y/o mecanismos mediados por el receptor ADCC/Fc.

En la trombocitopenia autoinmune se incluye la púrpura trombocitopénica, y trombocitopenia mediada inmune en otros
5 esquemas clínicos, la destrucción de las plaquetas/remoción ocurre como resultado del anticuerpo o complemento unido a las plaquetas y remoción subsiguiente mediante el complemento de lisis, mecanismos mediados por el receptor ADCC o FC.

La tiroiditis incluye la enfermedad de Grave, tiroiditis
10 de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, y tiroiditis atrófica, es el resultado de una respuesta autoinmune contra los antígenos tiroideos con la producción de anticuerpos que reaccionan con las proteínas presentes en y a menudo específicas para la glándula tiroidea. Los modelos
15 experimentales existentes incluyen modelos espontáneos: ratas (ratas BUF y BB) y pollos (cepas de pollo obeso); modelos inducibles: inmunización de animales con cualquier tiroglobulina, antígeno microsomal tiroideo (peroxidasa tiroidea).

20 La diabetes mellitus Tipo I o diabetes dependiente de la insulina es la destrucción autoinmune de células de isleta pancreáticas; esta destrucción se media por auto-anticuerpos y células T auto-reactivas. Los anticuerpos para la insulina o el receptor de insulina también pueden producir el fenotipo
25 sin sensibilidad a la insulina.

Las enfermedades renales mediadas inmunes, que incluyen glomerulonefritis y nefritis tubulointersticial, son el resultado de un anticuerpo o linfocito T mediado por la lesión del tejido renal ya sea directamente como resultado de la producción de anticuerpos autoreactivos o células T contra los antígenos renales o indirectamente como resultado de la deposición de anticuerpos y/o los complejos inmunes en el riñón que es reactivo contra otros, antígenos no renales. Así, otras enfermedades inmune mediadas que resultan en la formación de complejos inmunes también pueden inducir la enfermedad renal mediada inmune como una secuela indirecta. Ambos mecanismos inmunes indirectos y directos producen una respuesta inflamatoria que produce/induce el desarrollo de la lesión en los tejidos renales con el deterioro de la función del órgano resultante y en algunos casos de progreso de la insuficiencia renal. Los mecanismos inmunes celulares y humorales pueden estar involucrados en la patogénesis de lesiones.

Las enfermedades de desmielinización de los sistemas nerviosos centrales y periféricos, que incluyen esclerosis múltiple; polineuropatía de desmielinización idiopática o síndrome de Guillain-Barré; y polineuropatía de desmielinización inflamatoria crónica, se cree que tiene una base autoinmune y resulta en una desmielinización nerviosa como resultado del daño causado por oligodendrocitos o a la

mielina directamente. En MS existe una evidencia que sugiere que la inducción de la enfermedad y la progresión es dependiente de los linfocitos T. La esclerosis múltiple es una enfermedad de desmielinización que es dependiente de los linfocitos T y tiene ya sea un curso que remite a la recaída o a un curso progresivo crónico. La etiología es desconocida; sin embargo, las infecciones virales, predisposición genética, ambiente, y autoinmunidad a todo contribuye. Las lesiones contienen infiltrados de linfocitos T predominantemente mediados, células microgliales y macrófagos de infiltración; linfocitos CD4⁺T son tipos celulares predominantes en las lesiones. El mecanismo de la muerte celular oligodendrocitos y desmielinización subsiguiente no es conocido pero es probablemente conducido por el linfocito T.

La enfermedad pulmonar inflamatoria y fibrótica, que incluye pulmonía eosinofílica; fibrosis pulmonar idiopática, y la neumonitis hipersensibilidad puede involucrar una respuesta inflamatoria inmune desregulada. La inhibición de esa respuesta sería el beneficio terapéutico.

La enfermedad de la piel autoinmune o inmune mediada incluye enfermedades de la piel bulosa, eritema multiforme y dermatitis por contacto son mediadas por auto-anticuerpos, la génesis que es dependiente de los linfocitos T.

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria mediada por los linfocitos T. Las lesiones contienen infiltrados de linfocitos T, macrófagos y células que procesan antígenos, y algunos neutrófilos.

5 Las enfermedades alérgicas, que incluyen asma; rinitis alérgica; dermatitis atópica; hipersensibilidad a los alimentos; y urticaria son dependientes de los linfocitos T. Estas enfermedades se median predominantemente por los linfocitos T inducidos por inflamación, inflamación mediada
10 por IgE o una combinación de ambos.

Las enfermedades asociadas con el trasplante, que incluyen el rechazo del injerto y la enfermedad del huésped contra injerto (GVHD) son dependientes de los linfocitos T; la inhibición de la función de linfocito T es mejor.

15 Otras enfermedades en las que la intervención de la respuesta inmune y/o inflamatoria tiene beneficio, son una enfermedad infecciosa que incluye pero no se limita a la infección viral (que incluye pero no se limita a SIDA, hepatitis A, B, C, D, E y herpes) infección bacteriana,
20 infecciones fúngicas, e infecciones parasitarias y por protozoarios (moléculas (o derivados/agonistas) que estimulan el MLR puede utilizarse terapéuticamente para reforzar la respuesta inmune de los agentes infecciosos), enfermedades de inmunodeficiencia (moléculas/derivados/agonistas) que
25 estimulan el MLR puede utilizarse terapéuticamente para

reforzar la respuesta inmune para condiciones de herencia, adquiridas, infecciosas inducidas (como en la infección del VIH), o iatrogénicas (es decir, como de la quimioterapia) inmunodeficiencia, y neoplasia.

5 Se ha demostrado que algunos pacientes de cáncer humanos desarrollan un anticuerpo y/o respuesta de linfocitos T a los antígenos en células neoplásicas. También se ha demostrado en modelos animales de neoplasia que la mejora de la respuesta inmune puede producir el rechazo o regresión de ese neoplasma particular. Las moléculas que refuerzan la respuesta de los
10 linfocitos T en MLR tienen utilidad *in vivo* reforzando la respuesta inmune contra la neoplasia. Las moléculas que refuerzan la respuesta proliferativa de los linfocitos T en el MLR (o agonistas de molécula pequeños o anticuerpos que
15 afectaron al mismo receptor en una forma agonista) puede usarse terapéuticamente para tratar el cáncer. Las moléculas que también inhiben la respuesta del linfocito en el MLR funcionan *in vivo* durante la neoplasia para suprimir la respuesta inmune a un neoplasma; tales moléculas pueden ser
20 expresadas ya sea por células neoplásicas o su expresión puede inducirse por el neoplasma en otras células. El antagonismo de tales moléculas inhibitorias (ya sea con el anticuerpo, los antagonistas de la molécula pequeños u otros medios) refuerzan el rechazo del tumor inmune mediado.

25

Adicionalmente, la inhibición de las moléculas con propiedades proinflamatorias puede tener el beneficio terapéutico en la lesión por reperusión; golpe; infarto al miocardio; arterioesclerosis; lesión pulmonar aguda; choque hemorrágico; quemadura; choque sepsis/séptico; necrosis tubular aguda; endometriosis; enfermedad colectiva degenerativa y pancreatitis. Los compuestos de la invención presente, por ejemplo, polipéptidos o anticuerpos, se administran a un mamífero, preferentemente un humano, de acuerdo con los métodos conocidos, tales como la administración intravenosa como un bolo o por la infusión continua durante un período de tiempo, mediante la administración intramuscular, intraperitoneal, intracerebral espinal, hipodérmica, intra-articular, intra sinovial, intratecal, oral, tópico, o inhalación (intranasal, intrapulmonar). Se prefiere la administración intravenosa o inhalada de polipéptidos y anticuerpos.

En la terapia inmunoadyuvante, otros regímenes terapéuticos, tal administración de un agente anti-cáncer, pueden combinarse con la administración de las proteínas, anticuerpos o compuestos de la presente invención. Por ejemplo, el paciente a ser tratado con un inmunoadyuvante de la invención también pueden recibir un agente anti-cáncer (agente quimioterapéutico) o terapia de radiación. La preparación y esquemas de dosificación para tales agentes

quimioterapéuticos pueden usarse de acuerdo a las instrucciones de fabricantes determinadas empíricamente por el practicante experimentado. La preparación y esquemas de dosificación para tal quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service, Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder, o siguiendo la administración del inmunoadyuvante o puede darse simultáneamente con este. Adicionalmente, un compuesto anti-estrógeno como el tamoxifen o una anti-progesterona tal como onapristona (ver EP 616812) puede darse en dosificaciones conocidas por tales moléculas.

Puede ser deseable también administrar anticuerpos contra otra enfermedad inmune asociada o tumor asociado con los antígenos, tal como anticuerpos que se enlazan a CD20, CD11a, CD18, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, o factor endotelial vascular (VEGF). Alternativamente, o adicionalmente, dos o más anticuerpos que enlazan al mismo a o dos o más antígenos diferentes descritos en la presente pueden ser coadministrados al paciente. A veces, puede ser beneficioso también administrar al paciente una o más citoquinas. En una realización, los polipéptidos IL-17A/F son coadministrados con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor de crecimiento puede administrarse primero, seguido por un polipéptido IL-17A/F. Sin embargo, también la administración simultánea o administración se contempla

primero. Las dosificaciones adecuadas para el agente inhibidor de crecimiento son aquellas presentemente usadas y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el polipéptido IL-17A/F.

5

Para el tratamiento o reducción en la severidad de la enfermedad relacionada inmune, la dosificación apropiada de un compuesto de la invención dependerá del tipo de la enfermedad a ser tratada, como se debió anteriormente, la
10 severidad y curso de la enfermedad, si el agente se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y respuesta al compuesto, y la discreción del médico asistente. El compuesto se administra adecuadamente una vez al paciente o
15 durante una serie de tratamientos.

Por ejemplo, dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad, aproximadamente 1 mg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0.1-20 mg/kg) del polipéptido o anticuerpo es una
20 dosificación candidata inicial para la administración al paciente, si, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante una infusión continua. Una dosificación diaria típica podría ir desde aproximadamente 1 mg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los
25 factores arriba expresados. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se sostiene hasta que ocurra una supresión

deseada de síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros
régimenes de la dosificación pueden ser útiles. El progreso
de esta terapia se supervisa fácilmente mediante técnicas
5 convencionales y ensayos.

S. Artículos de Fabricación

En otra realización de la invención, se proporciona un
10 artículo de fabricación que contiene los materiales (por
ejemplo, que comprende una molécula IL-17A/F) útiles para el
diagnóstico o tratamiento de los trastornos descritos arriba.
El artículo de fabricación comprende un recipiente y una
instrucción. Por ejemplo, los recipientes adecuados incluyen
15 botellas, frascos, jeringas, y tubos de ensayo. Los
recipientes pueden formarse de una variedad de materiales
tales como vidrio o plástico. El recipiente conserva una
composición que es eficaz para diagnosticar o tratar la
condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por
20 ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de la solución
intravenosa o un frasco que tiene un tapón de cierre con
aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la
composición normalmente es un polipéptido o un anticuerpo de
la invención. Una instrucción o etiqueta en, o asociada con,
25 el recipiente indica que la composición se usa para
diagnosticar o tratar la condición de opción. El artículo de
fabricación puede comprender además, un segundo recipiente

que comprende una solución amortiguadora farmacéuticamente aceptable, tal como la solución salina amortiguada con fosfato, una solución de Ringer y una solución de glucosa. Puede incluir además, otros materiales deseables desde el punto de vista del usuario y comercial, incluyendo otras soluciones amortiguadoras, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y paquetes insertados con los modos de empleo para su uso.

10 T. Diagnóstico y Prognosis de la Enfermedad Relacionada Inmune

Las proteínas de la superficie celular, como las proteínas que son sobreexpresadas en ciertas enfermedades relacionadas con lo inmune, son objetivos excelentes para los candidatos del fármaco o tratamiento de la enfermedad. Las mismas proteínas junto con las proteínas secretadas codificadas por los genes amplificados en los estados de la enfermedad relacionada inmune encuentran uso adicional en el diagnóstico y prognosis de estas enfermedades. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra los productos de la proteína de genes amplificados en la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, trastorno del intestino inflamatorio, u otra enfermedad relacionada inmune, puede usarse como diagnósticos o pronósticos.

25

Por ejemplo, los anticuerpos, que incluyen los fragmentos del anticuerpo, pueden usarse cualitativamente o cuantitativamente para detectar la expresión de proteínas codificada mediante genes amplificados o sobreexpresados ("productos" del gen de marcador). El anticuerpo está preferentemente provisto por ejemplo, con una etiqueta fluorescente perceptible, y el enlace puede supervisarse mediante microscopía de luz, citometría de flujo, fluorimetría, u otras técnicas conocidas en el arte. Estas técnicas son particularmente adecuadas, si el gen sobreexpresado codifica una proteína de la superficie celular. Tales ensayos de enlace se realizan esencialmente como se describió anteriormente.

La detección in situ del anticuerpo que se enlaza a los productos del gen marcador puede realizarse, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia o microscopía de immunolectrones. Para este propósito, un espécimen histológico se removi6 del paciente, y un anticuerpo etiquetado se aplica a 6l, preferentemente recubriendo el anticuerpo en una muestra biol6gica. Este procedimiento tambi6n permite determinar la distribuci6n del producto del gen marcador en el tejido examinado. Estar6 claro para los experimentados en el arte que una variedad amplia de m6todos histol6gicos est6 f6cilmente disponible para la detecci6n in situ.

Los siguientes ejemplos sólo se ofrecen para propósitos ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de forma alguna.

Todas las referencias de patentes y de la literatura
5 citadas en la especificación presente están en la presente incorporadas mediante la referencia en su totalidad.

EJEMPLOS

10 Los reactivos comercialmente disponibles a los que se refiere en los ejemplos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a menos que se indique de otra manera. La fuente de estas células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de la especificación, por
15 los números de acceso ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

EJEMPLO 1

20 Expresión Recombinante de una Citoquina IL-17 Novedosa
Identificada como IL-17A/F

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

25 Se transfectaron células de riñón 293 humanas con cantidades iguales de plásmidos que codifican los genes humanos IL-17, IL-17C e IL-17F, al usar un procedimiento de

precipitación con fosfato de calcio. Para cada matraz T-150
confluyente al 50%-80%, se mezclaron 50 µg de cada plásmido
para formar un precipitado para formar un sustrato sobre las
células. Un día después de la transfección, se removi6 50:50
5 de F12:DMEM que contiene 10% FCS, 5 mM de L-glutamina,
penicilina-estreptomicina y se reemplaz6 con medios PS24
media libres de suero y se cultivaron por cuatro d6as
adicionales. Despu6s de cuatro d6as, los medios
acondicionados se recolectaron, centrifugaron y filtraron de
10 forma est6ril, previo a la purificaci6n.

Purificaci6n de IL-17A/F recombinante

A. Fraccionamiento Inicial Etapa 1:

15

Dos litros y medio de medio acondicionado recombinante
IL-17A/F de cultivos transitorios de c6lulas de ri6n 293
humanas, se concentraron y dializaron contra 20 mM de acetato
de sodio, pH 5.0, 1 mM de azida de sodio (soluci6n
20 amortiguadora A) al usar una membrana de corte de 10
kilodaltones hasta un volumen de 480 mililitros, luego se
aplic6 a una columna Pharmacia HiLoad S Sepharose 26/10 a 6
ml/min. La columna se eluy6 con un gradiente lineal hasta
100% de Soluci6n amortiguadora B (20 mM de acetato de sodio,
25 1 M de NaCl, 1 mM de azida de sodio, pH 5.0) a una proporci6n
de 1%/minuto con una relaci6n de flujo de 6 ml/min
recolectando fracciones de 12 ml. El an6lisis SDS PAGE se

efectuó sobre las fracciones recolectadas de esta columna. Las proteínas se revelaron con tinción de plata. Se etiquetaron los marcadores de masa molecular par alas fracciones que contienen gel 25-37 (Figura 2). Las
5 fracciones 31 y 32 contenían una proteína con una masa molecular aparente de aproximadamente 33 kD consistente con IL-17A/F.

B. Purificación de IL-17A/F:

10 Cuatro ml de la fracción 32 (Figura 2) se acidificaron con ácido trifluoroacético al 0.1% luego se aplicó a 0.5 ml/min a una columna Vydac C4 equilibrada en ácido trilfluoroacético al 0.1% (Solución amortiguadora C) y gradiente eluido al 100% de Solución amortiguadora D (ácido
15 trifluoroacético al 0.1% en 100% de acetonitrilo) con un gradiente de tres etapas (0-35% D durante 10 minutos, 35-50% D durante 35 minutos, 50-100% D durante 10 minutos). La Figura 2 muestra el cromatograma de las proteínas eluidas medido a 214 nm y 280 nm. El gradiente de etapas de
20 acetonitrilo, se sobrepone sobre el perfil. La concentración de proteínas de la fracción 38 se encontró que era 0.536 mg/ml por análisis de aminoácidos. Geles, tinciones, secuencias de aminoácidos y ensayos de actividad se corrieron sobre esta fracción.

25

La fracción 31 y el volumen restante de la fracción 32, de la corrida de HiLoad S Sepharose se acumularon y dializaron contra la Solución amortiguadora A por ocho horas al usar una membrana de corte de 10 kD y se pasó a través de un filtro de 0.2 micras. Este material se cargó sobre una columna Mono S equilibrada en Solución amortiguadora A a una relación de flujo de 1 ml/min y se eluyó con un gradiente de tres etapas hasta el 100% de Solución amortiguadora B (0-30% B sobre 10 volúmenes de columna, 30-75% B sobre 45 volúmenes de columna, 75-100% B sobre 10 volúmenes de columna) mientras se recolectaba 1 ml/fracción. Se ensayaron las fracciones 26-43 y se determinaron las concentraciones de proteínas por análisis de aminoácidos. La concentración de las fracciones 31, 32 y 33 fueron 0.258, 0.359 y 0.291 mg/ml respectivamente. Se corrieron geles, tinciones, secuencias de aminoácidos, ensayos de espectrofotometría de masas y actividad principalmente sobre la fracción 32 y 33. Las fracciones generadas por cromatografía se ensayaron para el contenido de IL-17 y IL-17F mediante el uso de inmunotinción Western. Se usó un $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo monoclonal dirigido contra ya sea IL-17 o IL-17F para detectar la presencia de ya sea IL-17 o IL-17F en las muestras.

Análisis por Espectrometría de Masas de IL-17A/F

Se determinaron la secuencia de aminoácidos y los enlaces de bisulfuro entre cadenas del IL-17A/F maduro por análisis de espectrometría de masas (ver Figura 4A; polipéptido heterodimérico IL-17A/F mostrado con ligaduras de bisulfuro entre cadenas e intra-cadenas). Se detectaron dos ligaduras de bisulfuro entre cadenas entre las cadenas de polipéptidos IL-17F e IL-17 [entre el residuo 47_{IL-17F} y el residuo 129_{IL-17}; y entre el residuo 137_{IL-17F} y el residuo 33_{IL-17}, respectivamente (líneas negras en negritas en la Figura 4A). Además, dos ligaduras intra-cadenas se forman en cada una de las cadenas del polipéptido homodímero IL-17 [entre los residuos 102 y 152; y entre los residuos 107 al 154] e IL-17F [entre los residuos 94 y 144; y entre los residuos 99 y 146] (líneas negras tenues en la Figura 4A). Los aminoácidos se numeran con relación a la metionina de inicio en cada cadena precursora de polipéptido (Figura 4A). La Figura 4B muestra un esquema de los fragmentos de péptido IL-17A/F que contienen los enlaces bisulfuro entre la cadena IL-17 y la IL-17F que se anticiparía por digestión del IL-17A/F con tripsina [IL-17A/F fragmento de enlace a bisulfuro #1 se designa como SEQ ID NO:7; fragmento de enlace a bisulfuro #2 de IL-17A/F se designa como SEQ ID NO:8, respectivamente]. Los aminoácidos contenidos dentro de estos fragmentos se indican y numeran con relación a la metionina de inicio de cada cadena.

La masa molecular aproximada calculada de estos fragmentos que se observaría por espectrometría de masas se muestra en la Figura 4B como 3410.58 Da y 2420.05 Da [IL-17A/F, fragmento de enlace a bisulfuro #1 y #2
5 respectivamente]. Se efectuó el mapeo de péptidos por tiempo de ionización/desorción por láser asistido en matriz de la espectrometría de masas de vuelo (MALDI-TOF) (Figura 4C). 55 pmol de IL-17A/F en una solución amortiguadora de 400 mM NaCl, solución amortiguadora 20 mM de NaOAC, pH 5 se digirió
10 hasta el día siguiente a 37°C con tripsina grado secuencias de Promega. Se efectuó el tiempo de ionización/desorción por láser asistido en matriz de la espectrometría de masas de vuelo (MALDI-TOF) con extracción retardada en modo de reelección de iones positivo al usar una matriz de 2', 4',
15 6'-trihidroxiacetofenona. El mapa de péptidos resultante contenía picos con $[M+H]^+ = 2420.12$ Da para el fragmento #2 y 3410.60 Da para el fragmento #1, consistente con los péptidos ligados a bisulfuro (Figura 4C). Se digirió una segunda alícuota de muestra a un pH de 8 después de la reducción de
20 los enlaces bisulfuro con ditioneitol y la alquilación de los grupos sulfhidrilo con iodoacetamida. El espectro MALDI-TOF de esta muestra carecía de los picos en cuestión, apoyando su asignación como ligado al disulfuro. La muestra no reducida se caracterizó además por espectrometría de masas
25 de trampa de iones con ionización por electroroció y

cromatografía líquida (LC-ESI-MS) (Figura 4D). Los cromatogramas de iones (de arriba hacia abajo) representan el cromatograma de iones total, cromatograma de iones reconstruido (RIC) del fragmento de enlace a bisulfuro #2 de IL-17A/F [M+2H]²⁺, y el fragmento de enlace a bisulfuro #1 de IL-17A/F [M+2H]³⁺. Los picos consistentes con ambos heterodímeros se observaron mientras que no se observaron picos arriba del ruido químico de fondo en las masas anticipadas de los péptidos homodiméricos, indicando así la ausencia de los homodímeros IL-17 o IL-17F. La composición de los heterodímeros ligados a bisulfuro luego se confirmó por espectrometría de masas en tándem. La disociación inducida por colisión del precursor con carga doble a m/z 1210.9, correspondió con el fragmento de enlace a bisulfuro #2 de IL-17A/F y el precursor triplemente cargado a m/z 1138.0 correspondió al fragmento de enlace a bisulfuro #1 de IL-17A/F. Los picos predichos del fragmento de la serie de iones "b" e "y" se observaron en los espectros correspondientes.

20

Selección de la Colección de Fagos para Anticuerpos que se Enlazan a IL-17A/F

Con objeto de identificar los anticuerpos los cuales se enlazan a IL-17A/F, se seleccionó una colección de fagos de anticuerpos sintéticos Fab. Se identificaron treinta y cuatro

(34) clonas independientes que codifican diferentes secuencias de anticuerpos Fab, las cuales podían mediar el enlace a IL-17A/F. La colección de fagos de las secuencias humanas de anticuerpos se prepararon y seleccionaron para Fab específico de antígenos en una forma similar a aquella previamente descrita (Gerstner, R. B. et al., J. Mol. Biol., 321(5):851-62 (2002). Brevemente, el anticuerpo monoclonal humanizado 4D5, un anticuerpo anti-HER2, se usó como un andamiaje para construir colecciones con despliegue de fagos de Fab. Estos Fab se despliegan en el fago de forma monovalente y/o divalente por fusión a una cremallera de leucina homodimerizable. Para generar la diversidad de la colección, se elige colocar de forma aleatoria los residuos de superficie CDR de cadena pesada expuestos que también se encontraron por ser altamente diversos en la base de datos Kabat de las secuencias naturales de anticuerpos y formar un parche contiguo. Adicionalmente, se usa la mutagénesis dirigida al sitio con codones degenerados a la medida, para generar la diversidad de aminoácidos que imita el repertorio inmune natural en cada sitio CDR. Primero dos CDR de cadena pesada, H1 y H2, se les permitió una diversidad limitada de la misma longitud como la Herceptina, mientras que H3 se diseñó para tener una alta degeneración con una longitud en el intervalo de 7 a 19. Todos los anticuerpos generados de la selección inicial de la colección tienen la cadena ligera

idéntica. Los IgG o Fab de longitud completa se pueden generar por clonación de una etapa del dominio variable de cadena pesada en vectores que proporcionan la secuencia de región constante específica del isotipo deseado. Para mejorar
5 además la afinidad de los enlaces de la colección de cadena pesada, se puede emplear una aleatorización de segunda etapa de los CDR de cadena ligera. La secuencia de aminoácidos de la región del dominio variable de las cadenas pesadas que contiene las tres (3) CDRs [H1-H3] de Fab que enlazan a IL-
10 17A/F se muestran en la Figura 6. Se muestra la alineación de una región de la secuencia de aminoácidos predicha de 34 clones Fab que codifican diferentes secuencias de cadena pesada de anticuerpos que pueden enlazar a IL-17A/F. Las tres regiones CDR de cadena pesada se indican como CDR-H1,
15 CDR-H2 y CDR-H3, respectivamente están sombreadas. El SEQ ID NO correspondiente para cada clon es como sigue:

Clon #1 = SEQ ID NO:9; Clon #2 = SEQ ID NO:10; Clon #3 = SEQ ID NO:11; Clon #4 = SEQ ID NO:12; Clon #5 = SEQ ID NO:13; Clon #6 = SEQ ID NO:14; Clon #7 = SEQ ID NO:15; Clon #8 = SEQ
20 ID NO:16; Clon #9 =SEQ ID NO:17; Clon #10 = SEQ ID NO:18; Clon #11 = SEQ ID NO:19; Clon #12 = SEQ ID NO:20; Clon #13 = SEQ ID NO:21; Clon #14 = SEQ ID NO:22; Clon #15 = SEQ ID NO:23; Clon #16 = SEQ ID NO:24; Clon #17 = SEQ ID NO:25; Clon #18 = SEQ ID NO:26; Clon #19 = SEQ ID NO:27; Clon #20 =SEQ ID
25 NO:28; Clon #21 = SEQ ID NO:29; Clon #22 = SEQ ID NO:30; Clon

#23 = SEQ ID NO:31; Clon #24 = SEQ ID NO:32; Clon #25 = SEQ ID NO:33; Clon #26 = SEQ ID NO:34; Clon #27 = SEQ ID NO:35; Clon #28 = SEQ ID NO:36; Clon #29 = SEQ ID NO:37; Clon #30 = SEQ ID NO:38; Clon #31 = SEQ ID NO:39; Clon #32 = SEQ ID NO:40; Clon #33 = SEQ ID NO:41; Clon #34 = SEQ ID NO:42, respectivamente.

Además, las secuencias de ADN codificadoras correspondientes para cada una de las treinta y cuatro (34) clonas se muestra en la Tabla 7 a continuación (SEQ ID NO:43 a SEQ ID NO:76, respectivamente).

Tabla 7

SEQ ID NO:43:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGATTCCGCTATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTGGGATTACTCCTTATAGCGGTTATACTGACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAAGAGGCCC
GCGAGGGCTACGACGTCGGCTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

20

SEQ ID NO:44:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGATTCCCTATATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTGAAATTTCTCCTCCTGGCGGCGATACTTACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAACACAGCCTAC

25

CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTCTCTTGT
GGTGGTGGGACGGGGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:45:

5 TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAATACTTGGATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTGTTATTACTCCTTATGGCGGTGCTACTTACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAGAGAGTA
TGTGGAGTAAGTTCGACTACTGGGGTCAA

10

SEQ ID NO:46:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTTCTGCTATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTTATATTACTCCTGATAACGGTGATACTAACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
15 CTACAAATGAACAGCTTAATAGCTGAGGATACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCGGCCACG
GCAACTTCTACGGTACCTGGGCGGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:47:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGGTTCTGATATACACTGGGTGCGTCAGG
20 CCCCCGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTTATATTAATCCTTATGGCGGTCTACTGACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGCGTACG
AGATGTGGTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

25 SEQ ID NO:48:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAATTCCTGGATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGTGTATTACTCCTTCTAGCGGTCTACTTACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGGTCT
5 TCCCCGACATCGGGGACTGCAGCAACGCCTACTGCTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:49:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAGTACTTATATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGCTTGGATTTCTCCTTATAGCGGTATACTGACTA
10 TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGGTGG
GGTGGGGGGACTCGTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:50:

15 TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGGTTCTTGGATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGCTGGGATTTATCCTTATGACGGTTATACTTACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGGCCG
AGGGCCTGTACCAGTCCGGGATCTACGACGCGGGTATGGACTACTGGGGTCAA

20

SEQ ID NO:51

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAGTTACTATATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGCTTGGATTTATCCTGCTGACGGTGCTACTTACTA
25 TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC

CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGGGTCCCT
ACTTCGGGGGCTACGATATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:52:

5 TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAATGATTCTGATATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGTTGTTATTATTTATCCTTATGACGGTTATACTTACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAAGCAACC
TGGACAACAACCTTGTTGCGACTACTGGGGTCAA

10

SEQ ID NO:53

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAATGGTTACTGGATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTGATATTAATCCTAATGGCGGTTCTACTAACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
15 CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGCCTACC
GGTGCGGCGGGCTCGCCGACTGGGCCGGGGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:54:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGGTTCTTGGATACACTGGGTGCGTCAGG
20 CCCCCGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTATTATTACTCCTTCTGGCGGTAATACTGACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGGTCT
TCGCCGTGTCGACCGCCGGCTACCCCTGGGTTATGGACTACTGGGGTCAA

25 SEQ ID NO:55:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATTCTTGGATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGTTCTATTACTCCTTATAACGGTAATACTGACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCAGGGGGG
5 AGTCCGACGAGGCCTACGCCGCGGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:56:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTAGTTCCGATATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGTACTATTAATCCTGCTAGCGGTTCTACTGACTA
10 TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCGGCGCCA
ACAGCAGCTTCTACGCGCTCCAGTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:57:

15 TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATAATTATATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGTTGGATTTCTCCTTATAGCGGTTATACTTACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGACCC
TCTTCTACGACAAGGACCAGTACTCCTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

20

SEQ ID NO:58:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTAGTTCTTATATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGTTGGATTTCTCCTTATAGCGGTTATACTGACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC

CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGGGGC
TCCTGCGGTGGGGCTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:59:

5 TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATAATGGGATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGTTGGATTACTCCTACTAGCGGTTATACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCGACGGGG
ACACCTGGAAGTGGGACGCCCCGTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

10

SEQ ID NO:60:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAATACTTATATACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGTTGGATTTCTCCTTATAGCGGTTATACTGACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGACCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
15 CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCGAGATCT
TGCTGGACTACGGTTCCGCGGGCTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:61:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAGTACCTGGATACACTGGGTGCGTCAGG
20 CCCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGTGTTATTACTCCTACTAACGGTTCTACTTACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCGAGGTGT
GGTGGTGGGGCGACGGCCACGGCTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

25 SEQ ID NO:62:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTAGTTCTGCTATACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGTGGGATTACTCCTGCTAGCGGTATACTTACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCTCGCCCCG
5 GCGGGGTGTTTCGTCGACGGCGGGGTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:63:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAATAGTACTGATATACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGTAGGATTAATCCTTCTGGCGGTCTACTAACTA
10 TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTACCAGCG
CGTACACCACGTGGGCGGTCTGACTGGTTCATCGGCTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:64:

15 TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGGTTACGGGATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGCTTGGATTTCTCCTTCTAACGGTTATACTTACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTCGCGTCA
GCTACTACGTCTACAGGCACGACTGGGTGAGGGGCTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

20

SEQ ID NO:65:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATACCTGGATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGTGTATTACTCCTTATGGCGGTATACTTACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC

CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAGACGGGG
GCTTCTTCGATTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:66:

5 TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGATTCCCTCTATACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTTTTATTTATCCTACTAGCGGTTCTACTTACTA
TGCCAATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCACGTGCCTCGT
ACGGGGTGAGCAAGTGGACCTTTGACTACTGGGGTCAA

10

SEQ ID NO:67:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGGTTACGGGATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTTGGATTTCTCCTTCTAACGGTTATACTTACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCATAACACATCCAAAAACACAGCCTAC
15 CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTCGCGTCA
GCTACTACGTCTACAGGCACGACTGGGTCAGGGGCTACGTTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:68:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGGTACTTATATACTGGGTGCGTCAGG
20 CCCCCGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTTGGATTTCTCCTTATAGCGGTTATACTAACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAGAGGCCC
GCTCCTCGTTGAGCGCGGACTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:69:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATAATTATATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTTGGATTTCTCCTTATAGCGGTATACTTACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
5 CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTGAGTCCG
GCTTCTCCGCGTGCAACACGCGGGCGTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:70:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGATTCTTGGATACACTGGGTGCGTCAGG
10 CCCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTTCTATTACTCCTTATAACGGTAATACTGACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGCAGGGGGG
AGTCCGACGAGGCCTACCCCGCGGTTATGGACTACTGGGGTCAA

15 SEQ ID NO:71:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTAGTACCGCTATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTTGGATTACTCCTTATGACGGTTATACTGACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACTAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTACGTGGT
20 TCACGCTGGCCTCGGCTATGGAACACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:72:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTACTGGTAATGGGATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTTGGATTTCTCCTACTAACGGTTCTACTTACTA
25 TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC

CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTAGGGTCG
ACTACCAGGTCTACCACGACCGCTTCGAGGAGGGGTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:73:

5 TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAATAGTTATTGGATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGTTGGATTTCTCCTGATAACGGTGCTACTAATA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTAAGTTCT
GGGGCTGGGACTGGGGGGGTATGGACTACTGGGGTCAA

10

SEQ ID NO:74:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGATTCTTATATACACTGGGTGCGTCAGG
CCCCGGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGTGATATTACTCCTACTGACGGTTATACTGACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
15 CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTAACTTGA
TGTGGTGGGACTCGTCGGCTATGGACTACTGGGGTCAA

SEQ ID NO:75:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAGTGATTCTGGGATACACTGGGTGCGTCAGG
20 CCCCCGGTAAGGGCCTGGAATGGGTGGTTTTATTTATCCTAATGGCGGTTCTACTTACTA
TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCTCGTATGTCGT
TGATCGGGTTCTCGTACGCTATGGACTACTGGGGTCAA

25 SEQ ID NO:76:

TTGTCCTGTGCAGCTTCTGGCTTCACCATTAATAGTACCTGGATACACTGGGTGCGTCAGG
 CCCC GGTAAGGGCCTGGAATGGGTGCTTGGATTAATCCTTATAACGGTTCTACTTACTA
 TGCCGATAGCGTCAAGGGCCGTTTCACTATAAGCGCAGACACATCCAAAAACACAGCCTAC
 CTACAAATGAACAGCTTAAGAGCTGAGGACACTGCCGTCTATTATTGTGCAAGAGACTTGT
 5 ACGACTACGACATCGGCTTCGACTACTGGGGTCAA

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

Los fragmentos aislados de la etapa de purificación
 10 Vydac C4 descritos arriba (Figura 3) se ensayaron para la
 capacidad de IL-17A/F para inducir la producción de IL-8. Los
 fragmentos fueron probados mediante la incubación con células
 TK-10 durante 24 horas (0.033 fracción en microlitros/ml del
 medio de cultivo celular). Los medios acondicionados se
 15 recolectaron entonces y las mediciones de la concentración de
 IL-8 e IL-6 se realizaron en cada fragmento por ELISA. Se
 encontró que el fragmento 38 se tenía actividad resistente.
 La concentración de la proteína del fragmento 38 se encontró
 de 0.536 mg/ml para el análisis del aminoácido. Los geles,
 20 tinciones, secuencias del aminoácido y ensayos de actividad
 en este fragmento se ejecutaron (Figura 3). Alternativamente,
 el fragmento 31 y el volumen restante del fragmento 32, de la
 corrida de Sefarosa HiLoad se agrupó y dializó contra la
 Solución amortiguadora A para ocho horas usando una membrana
 25 de corte de 10 de kD y que pasa a través de un filtro de 0.2

micras. Este material se cargó en una columna Mono S equilibrada en la solución amortiguadora A a una proporción de flujo de 1 ml/min y se eluyó con un gradiente de tres etapas a la solución amortiguadora del 100% B (0-30% B sobre
5 10 volúmenes de columna, 30-75% B sobre 45 volúmenes de columna, 75-100% B sobre 10 volúmenes de columna) mientras se recolecta 1 ml/fracción. Se ensayaron los fragmentos 26-43 y las concentraciones de la proteína se determinaron por el análisis del aminoácido. La IL-17A/F pura se identificó en
10 fragmentos 31-33 como una sola proteína con masa molecular aparente de 30-35 kD. Las concentraciones de fragmentos 31, 32 y 33 fueron de 0.258, 0.359 y 0.291 mg/ml respectivamente. Las geles y análisis de secuencia de la proteína mostraron este material para ser idéntico a IL-17A/F purificado
15 mediante la columna C4 (arriba). Las curvas de respuesta a las dosis que comparan la inducción de IL-8 e IL-6 mediante IL-17A/F, IL-17 e IL-17F se muestra en la Figura 5. Las IL-17A/F, IL-17 e IL-17F se incubaron con las células TK-10 en concentraciones indicadas durante 24 horas. El medio
20 condicionado con TK-10 se reunió y analizó por IL-8 ELISA e IL-6 ELISA.

Discusión

La Co-expresión de mRNA para IL-17 e IL-17F lleva a la
25 secreción de nuevas especies de la proteína que pueden

enlazarse con ambos de ciertos anticuerpos, que son capaces de enlazar IL-17 y ciertos anticuerpos que son capaces de enlazar IL-17F. Esta nueva especie de proteína se designa en la presente como interleucina-17A/F (IL-17A/F). Esta especie
5 no se observa cuando 293 células del riñón humano se elaboran o expresan ya sea IL-17 o IL-17F en aislamiento. Los medios condicionados de las células transfectadas se inmunoprecipitaron (IP) utilizando anticuerpos que pueden reconocer IL-17 (pistas 1-5) o IL-17F (pistas 6-10) como se
10 muestra en la Figura 1A y Figura 1B. Las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron entonces mediante el análisis de inmunotinción Western y teñido con los anticuerpos IL-17 (Figura 1A) o IL-17F (Figura 1B). La detección de IL-17A/F se indica en la pista 8 de la Figura 1A
15 y en la pista 3 de la Figura 1B mediante la presencia de IL-17 en el complejo dimérico con IL-17F. La masa molecular de esta especie, como se determinó por la SDS-PAGE no reductora es aproximadamente de 30-35 kD, consistente con las especies que comprenden una molécula de IL-17 y una molécula de IL-17F
20 unidas por un enlace covalente. La existencia de esta nueva especie (IL-17A/F) también puede reconocerse como proteína de movilidad electroforética que es distinta de la observada cuando IL-17 o IL-17F se expresan en aislamiento. Como tal, estas nuevas especies también pueden visualizarse sin el uso
25 de anticuerpos a través del uso de otros métodos de detección

de proteínas tales como las técnicas de teñido de proteínas convencional.

La existencia de una nueva especie de proteína producida por la co-expresión de IL-17 e IL-17F también se observó resolviéndose las proteínas secretadas presentes en medios
5 condicionados con la cromatografía de fase inversa. La comparación de los fragmentos de la proteína observados de las proteínas secretadas producidas por células que co-expresan IL-17 e IL-17F con los patrones observados con
10 células que producen IL-17 o IL-17F reveló la presencia de una especie de proteína adicional. Esta especie de proteína, IL-17A/F, se purificó y aisló a homogeneidad mediante cromatografía de columna (Figura 2 y 3).

La proteína purificada se corrió como una sola banda de
15 aproximadamente 30-35 kD determinada por la SDS-PAGE no reducida (Figura 3A). Sin embargo, bajo condiciones de reducción dos bandas aparentemente distintas se revelaron con una masa molecular aparente de aproximadamente 15-18 kD (no se muestra). Así, IL-17A/F es un dímero covalente. Un medio
20 independientes de evaluar la composición de la nueva proteína, el análisis de secuencia del péptido en el en el N terminal, indicaron también aparentemente que los IL-17A/F aislados contienen ambos péptidos IL-17 e IL-17F (Figura 3B). Las secuencias del péptido detectadas son idénticas a la
25 secuencia contenida dentro del extremo en el N terminal de

IL-17 e IL-17F (Figura 3C). El análisis de inmunotinción Western indicó que esta nueva especie de proteína también puede interactuar con ambos, con un anticuerpo que puede enlazar a IL-17 y con un anticuerpo que puede enlazar a IL-17F. Cada una de estas observaciones y la masa molecular distinta de las especies de la proteína aislada nueva sugieren que la proteína aislada IL-17A/F es una nueva especie de proteína comprendida de una asociación covalente de IL-17 e IL-17F.

La existencia y ubicación de los enlaces de bisulfuro que se unen a las cadenas IL-17 e IL-17F de IL-17A/F se caracterizó además por el uso de espectrometría de masa. La posición de enlaces de bisulfuro dentro de IL-17A/F se muestra en la Figura 4A esquemática. Dos enlaces de bisulfuro de la intercadena se enlazan a las cadenas IL-17 e IL-17F en IL-17A/F. La digestión de IL-17A/F con tripsina se esperaba que produzca dos fragmentos de péptido distintos que contienen los enlaces de bisulfuro de intercadena (fragmento de enlace de bisulfuro IL-17A/F #1 y #2; SEQ ID NOs:7 y 8, respectivamente. Estos péptidos se muestran esquemáticamente (Figura 4B) junto con la masa molecular respectiva. Estos péptidos se observaron mediante un tiempo de desorción/ionización del láser asistido por matriz de espectrometría de masa en vuelo (MALDI-TOF) (Figura 4C) y mediante espectrometría de masa de captura de iones o

ionización por electrospray de cromatografía líquida (LC-ESI-MS) (Figura 4D). Los picos del péptido que corresponden a los homodímeros de IL-17 o IL-17F no se detectaron, indicando que el IL-17A/F purificado comprendió heterodímeros covalentes de cadenas IL-17 e IL-17F y o no contuvieron niveles perceptibles de homodímeros IL-17 o IL-17F.

Además, los anticuerpos que enlazan IL-17A/F se han identificado mediante separación por exclusión de una colección del fago de anticuerpos de Fab sintéticos. Se identificaron treinta cuatro (34) clones independientes que codifican las secuencias del anticuerpo Fab distintas. Las cuales fueron capaces de enlazar IL-17A/F. La secuencia del aminoácido de la región de dominio variable de las cadenas pesadas que contienen los tres (3) CDRs [H1-H3] de Fab que enlaza IL-17A/F se muestra en Figura 6. Lo que se muestra es la alineación de una región de la secuencia del aminoácido de 34 clones Fab que codifican a las secuencias de cadena pesadas del anticuerpo distinto que pueden enlazar a IL-17A/F. Las tres regiones CDR de cadena pesada que se indican como CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3, respectivamente se resaltan en amarillo. Las secuencias del aminoácido correspondientes para cada una de los treinta y cuatro (34) clones se identifican como las SEQ ID NOS:9-42. Además, la codificación correspondiente a las secuencias de ADN para cada uno de los treinta cuatro (34) clones se muestran en la Tabla 7 debajo

(SEQ ID NO:43 a la SEQ ID NO:76, respectivamente). Así, los anticuerpos específicos que se enlazan selectivamente al nuevo complejo heterodimérico IL-17A/F se ha identificado qué puede servir para modular la actividad de esta nueva
5 citoquina.

La IL-17A/F se analizó por su capacidad para estimular una respuesta proinflamatoria usando la línea celular de riñón TK-10 humano (Figura 5). Esta línea celular responde a ambos IL-17 e IL-17F para la producción de IL-8. La IL-17A/F
10 también indujo robustamente la producción IL-8 en esta línea celular (Figura 5A). Interesantemente, la IL-17A/F fue observada para tener una única potencia que difiere de IL-17 o IL-17F. La diferencia en la actividad difiere de IL-17 e IL-17F por aproximadamente un orden de magnitud en cada caso.
15 La actividad substancialmente mayor de IL-17A/F que IL-17F en este ensayo sugiere que IL-17A/F puede comprender un componente crítico de la actividad de la citoquina que resulta del producto del gen IL-17F. Esta única potencia puede permitir a la molécula poseer un rango distinto de
20 acciones in vivo. La IL-17A/F también indujo la producción de IL-6 de esta línea celular (Figura 5B). Adicionalmente, es probable que IL-17A/F puede poseer características adicionales no presentes ya sea en IL-17 o IL-17F como resultado de esta nueva composición heterodimérica que puede

pelotillas de las células restantes. Los linfocitos T humanos se aislaron entonces mediante la selección negativa usando un kit de aislamiento de células T CD4⁺ (MACS). Para activar los linfocitos T aislados, los frascos del cultivo del tejido se
5 revistieron con 5 ug/ml cada uno de anti-CD3, (BD Bioscience) y anti-CD28 (BD Bioscience) en PBS durante toda la noche a 4 grados C. Después de remover el medio de revestimiento, los linfocitos T humanos aislados se colocaron en placas en RPMI completo a una densidad aproximada de 2 millones de células
10 por mililitro del medio. Las muestras del medio se recogieron en varios intervalos de tiempo siguiendo la formación de placas y se ensayaron para IL-17A/F por ELISA. Los sobrenadantes de control no activado se recogieron de los sobrenadantes celulares de frascos no cubiertos con anti-CD3
15 y anti-CD28.

Medición por ELISA de la Producción de IL-17A/F Humano en Células T humanas activadas por Anti-CD3/Anti-CD28.

Los niveles de IL-17A/F Humano se midieron por ELISA. El
20 anti-humano IL-17 de ratón se diluyó en la solución amortiguadora de cubierta (0.05 M solución amortiguadora de carbonato sódico, pH 9.6) y revistió en placas de 96-pozos de microtitulación (Nunc), durante 12-15 horas a 2-8°C. Se realizaron todos los pasos subsiguientes a la temperatura
25 ambiente. El enlace no específico se bloqueó vaciando los

pozos y agregando la solución amortiguadora de bloque (PBS, 0.5% BSA, 10 ppm Proclín 300). Después de una incubación de 1 hora, los pozos se lavaron con la solución amortiguadora de lavado (PBS, 0.05% Tween 20, 10 ppm Proclin 300). Se agregó entonces el estándar y las muestras de referencia IL-17A/F de humano diluidas en una solución amortiguadora del ensayo (PBS, 0.5% BSA, 0.05% Tween 20, 10 ppm Proclin 300). Siguiendo una incubación de 2 horas, los pozos se lavaron con la solución amortiguadora de lavado. El IL-17F anti-humano de ratón biotinilado, diluido en la solución amortiguadora de ensayo, se agregó y se dejó incubar durante 1 hora. Después de lavar las placas con la solución amortiguadora de lavado, estreptavidina-HRP (peroxidasa de raíz de rábano) (Amersham), se diluyó en la solución amortiguadora del ensayo, se agregó y dejó incubar durante 1 hora. Después de lavar las placas con la solución amortiguadora de lavado, se agregó la solución del substrato, TMB (tetra metil bencidina)-Peroxidasa (R & D Systems). El desarrollo del color se detuvo agregando 2 N de ácido sulfúrico. Las placas se leyeron entonces en un lector de placa de microtitulación (SLT) a 450 nM con un espacio en blanco substraído a 540 nM. Se usó un programa de ajuste de curvas de cuatro parámetros para generar una curva normal, y las concentraciones de la muestra fueron derivadas por la interpolación de la porción lineal de la curva. La IL-17A e IL-17F se incluyeron como controles

activos en la ELISA para ilustrar la especificidad del ensayo para IL-17A/F (Figura 12).

Resultados:

Los resultados de las mediciones de ELISA de la
5 producción de IL-17A/F se muestran en la Figura 11. Estos
estudios demuestran la producción de una nueva citoquina IL-
17A/F de células de linfocitos T humanos activados por anti-
CD3/anti-CD28 comparadas con las células T no humanas en
donde la no se detectó la producción de IL-17A/F. Estos
10 resultados muestran para la primera vez la ocurrencia natural
de una nueva citoquina que se produce y libera en respuesta a
la activación de los linfocitos T humanos. Además, la
especificidad del ensayo de ELISA se demostró observando las
cantidades casi equivalentes de IL-17A/F en tres muestras
15 (#31-#33) cuando se ensayaron en paralelo. Las cantidades
despreciables de IL-17A o IL-17F se detectaron en esta en
esta ELISA específica para IL-17A/F (Figura 12).

Los estudios descritos en la presente en ambos Ejemplos
1 y 2 establecen que IL-17A/F humano recombinante es una
20 nueva citoquina distinta, discernible de la IL-17 e IL-17F
humana en ambas, estructura de la proteína y en los ensayos
de actividad basados en la célula. A través del uso de IL-
17A/F recombinante humana purificada como un estándar, se ha
desarrollado una ELISA IL-17AF-específica humana (mostrado en
25 la Figura 11). A través del uso de esta ELISA específica, la

expresión inducida de humano IL-17A/F se detectó, confirmando que IL-17A/F se produce naturalmente de células T humanas activadas en el cultivo. Aquí, la IL-17A/F es una nueva citoquina distinta, perceptible como un producto natural de
5 células T humanas activadas aisladas cuya forma recombinante se ha caracterizado, en ambas, estructura de la proteína y los ensayos basados en la célula, por ser diferente y discernible de citoquinas relacionadas.

Esta nueva citoquina puede actuar para modular la
10 actividad de IL-17 in vivo, actuando como un inhibidor competitivo a los sitios de enlace para IL-17 u otras citoquinas relacionadas. La IL-17A/F también puede modular la actividad de otras citoquinas relacionadas por debajo de la regulación de los sitios de enlace de él y/o los sitios de
15 enlace para otras citoquinas relacionadas. La IL-17A/F puede exhibir actividad a través de adaptadores intracelulares o moléculas de señalización que actúan para afectar su propia actividad de señalización o que afectan a otras citoquinas relacionadas. La IL-17A/F tiene la capacidad de afectar el
20 apareamiento de receptores y co-receptores encontrados en la superficie de células o dentro del compartimiento intracelular.

Así, estos estudios proporcionan e identifican un nuevo estimulante inmune (es decir IL-17A/F) que puede impulsar al
25 sistema inmunológico a responder a un antígeno particular que

no puede haber sido previamente inmunológicamente activo. Como tal, el estimulante inmune recientemente identificado tiene aplicaciones clínicas importantes. Otros estimulantes inmunes conocidos como IL-12 se han identificado. [ver Gubler et al. PNAS 88, 4143 (1991)]. En un reciente ensayo de vacuna de cáncer, los investigadores de la Universidad de Chicago e Instituto de la Genética (Cambridge, MA) se han quedado luego de la actividad estimuladora inmune de IL-12, para el tratamiento del melanoma. [Peterson et al. Journal of Clinical Oncology 21 (12). 2342-48 (2003)]. Ellos extrajeron células sanguíneas blancas circulantes que llevan uno o más marcadores de células del melanoma, aisladas del antígeno, y las regresaron a los pacientes. Normalmente los pacientes no tendrían una respuesta inmune a su o sus propios antígenos humanos. Los pacientes se trataron entonces con dosis diferentes de IL-12, un estimulante inmune capaz de inducir la proliferación de células T que se han co-estimulado mediante células dendríticas. Debido al efecto estimulador inmune de IL-12, el tratamiento proporcionó resultados superiores en comparación con el trabajo más reciente, dónde las propias células dendríticas de pacientes se prepararon de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), tratadas con los antígenos, entonces se cultivaron in vitro y se devolvieron al paciente para estimular la respuesta anti-cáncer. Igualmente [Thurner et al. J. Exp. Med. 190 (11),

1669-78 (1999)], esta nueva citoquina IL-17A/F o agonistas de los mismos, encontraría por consiguiente, utilidad práctica como un estimulante inmune. Considerando que las moléculas inhiben la actividad IL-17A/F (antagonistas) se esperaría que
5 encuentren utilidad práctica cuando se desea una inhibición de la respuesta inmune, como en las enfermedades autoinmunes.

Así, los anticuerpos para esta nueva citoquina que imita (anticuerpos agonistas) o inhibe (anticuerpos antagonistas) las actividades inmunológicas de IL-17A/F poseería calidades
10 terapéuticas. Las moléculas pequeñas que actúan para inhibir la actividad de esta nueva citoquina también tendrían usos terapéuticos potenciales.

EJEMPLO 3

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

El siguiente método describe el uso de una secuencia del nucleótido que codifica IL-17A/F como una sonda de hibridación.

El ADN que comprende la secuencia de codificación de
20 longitud completa o IL-17A/F madura como se describe en la presente es empleado como una sonda para separar por exclusión los ADNs homólogos (como aquellas codificaciones de variantes que ocurren naturalmente de IL-17A/F) en colecciones de cADN de tejidos humanos o las colecciones
25 genómicas de tejido humanas.

La hibridación y lavado de filtros que contienen cualquier colección de ADNs se realiza bajo las siguientes condiciones de severidad alta. La hibridación de la sonda radioetiquetada derivada de IL-17A/F a los filtros se realiza
5 en una solución de 50% de formamida, 5x SSC, 0.1% SDS, 0.1% pirofosfato de sodio, 50 mM de fosfato de sodio, pH 6.8, solución de 2x Denhardt, y 10% de sulfato de dextrano a 42°C durante 20 horas. El lavado de filtros se realiza en una solución acuosa de 0.1x SSC y 0.1% SDS a 42°C.

10 Los ADNs que tienen una identidad de secuencia deseada con el ADN que codifica a la secuencia nativa de longitud completa IL-17A/F puede identificarse entonces usando técnicas estándar conocidas en el arte.

EJEMPLO 4

15 Expresión de IL-17A/F en *E. coli*

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de los polipéptidos IL-17A/F mediante la expresión recombinante en *E. coli*.

La secuencia de ADN que codifica a un polipéptido IL-
20 17A/F se amplifica inicialmente usando cebadores PCR seleccionados. Los cebadores deben contener sitios de enzima de restricción que corresponden a los sitios de enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado. Una variedad de vectores de expresión puede emplearse. Un ejemplo
25 de un vector adecuado es pBR322 (derivado de *E. coli*; ver

Bolivar et al., Gene 2:95 (1977)) que contiene genes para la resistencia a la ampicilina y tetraciclina. El vector se digiere con la enzima de restricción y desfosforilada. Las secuencias amplificadas por PCR se ligan entonces en el
5 vector. El vector incluirá preferentemente secuencias que codifican para un gen de resistencia antibiótico, un promotor *trp*, un líder poliHis (que incluye los primeros seis codones de STII, secuencia poliHis, y sitio de desdoblamiento de enterocinasa), la región que codifica al polipéptido IL-
10 17A/F, terminador transcripcional lambda, y un gen *argU*.

La mezcla de ligación se usa para transformar una cepa *E. coli* seleccionada usando los métodos descritos en el Sambrook et al., *supra*. Los transformantes son identificados por su capacidad de crecer en placas LB y entonces se
15 seleccionan las colonias resistentes antibióticas. El ADN del plasmado puede aislarse y confirmarse por el análisis de restricción y secuenciación del ADN.

Los clones seleccionados pueden hacerse crecerse durante la noche en el medio de cultivo líquido tal como un caldo de
20 LB complementado con antibióticos. El cultivo nocturno puede usarse para inocular un cultivo a una escala mayor. Las células se hacen crecer entonces a una densidad óptica deseada durante la cual, el promotor de la expresión se enciende.

Después de cultivar las células durante varias horas, las células pueden cosecharse por centrifugación. El peletizado celular obtenido por centrifugación puede ser solubilizada usando varios agentes conocidos en el arte, y la
5 proteína solubilizada IL-17A/F puede purificarse entonces usando una columna quelante metálica bajo condiciones que permiten un enlace firme a la proteína.

Los polipéptidos IL-17A/F pueden expresarse en *E. coli* en una forma etiquetada al poli-His usando el procedimiento
10 siguiente. El ADN que codifica a un polipéptido IL-17A/F se amplificó inicialmente usando los cebadores PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios de enzima de restricción que corresponden a los sitios de enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras
15 secuencias útiles que proporcionan una iniciación de traducción eficaz y fiable, la purificación rápida en una columna de quelación metálica, y remoción proteolítica con la enterocinasa. Las secuencias amplificadas por PCR, etiquetadas con poli-His son entonces ligadas a un vector de
20 expresión que se usa para transformar una hospedera de *E. coli* basada en la cepa 52 (fuhA(tonA W3110) lon gale rpoHts(htpRts) clpP(lacIq). Los Transformantes se hacen crecer primero en carbenicilina 50 mg/ml que contiene LB a 30°C con agitación hasta que se alcanza un O.D.600 de 3-5. Se
25 diluyen las cultivos entonces con 50-100 pliegues en el medio

CRAP (preparado por el mezclado de 3.57 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.71 g de citrato $\cdot$ 2H₂O de sodio, 1.07 g KCl, 5.36 g del extracto de levadura Difco, 5.36 g de hicasa de Sheffield SF en 500 mL de agua, así como 110 mm MPOS, pH 7.3, 0.55% (p/v) glucosa y 7 mm de MgSO_4) y se hizo crecer durante aproximadamente 20-30 horas a 30°C con agitación. Las muestras se remueven para verificar la expresión mediante el análisis SDS-PAGE, y el cultivo en volumen se centrifuga para formar paletizar las células. Las pelotillas celulares se congelan hasta la purificación y su replegado.

La pasta de E. coli de 0.5 a 1 L de fermentaciones (6-10 g de peletizados) se resuspende en 10 volúmenes (p/v) en guanidina 7 M, 20 mm Tris, solución amortiguadora pH 8. El sulfito de sodio sólido y tetratiónato de sodio se agrega para elaborar concentraciones finales de 0.1M y 0.02 M, respectivamente, y la solución se agita toda la noche a 4°C. Este paso produce una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados por sulfitolización. La solución se centrifuga a 40,000 rpm en un Ultracentrifugado Beckman durante 30 min. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de solución amortiguadora columna quelato metálico (guanidina 6 M, 20 mm Tris, pH 7.4) y se filtró a través de filtros de 0.22 micras para clarificar. El extracto clarificado se carga sobre 5 ml de columna de columna quelato metálico Ni-NTA Qiagen equilibrada en la ó en la solución

amortiguadora de quelato metálica. La columna se lava con una solución amortiguadora adicional que contiene 50 mM de imidazol (Calbiochem, grado Utrol), pH 7.4. La proteína se eluye con una solución amortiguadora que contiene 250 mM de imidazol. Se agrupan los fragmentos que contienen la proteína deseada y se almacenaron a 4°C. La concentración de la proteína se estima por su absorbancia a 280 nM usando el coeficiente de extinción calculado en base a su secuencia de aminoácidos.

Las proteínas se repliegan diluyendo la muestra despacio en la solución amortiguadora de replegado preparada recientemente que consiste de: 20 mM Tris, pH 8.6, 0.3 M NaCl, urea 2.5 M, cisteína 5 mM, glicina 20 mM y 1 mM EDTA. Los volúmenes de replegado son elegidos para que la última concentración de la proteína esté entre 50 a 100 microgramos/ml. La solución de replegado se agita suavemente a 4°C durante 12-36 horas. La reacción de replegado se apaga por la adición de TFA a una concentración final de 0.4% (pH de aproximadamente 3). Antes de la purificación adicional de la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0.22 micras y cianometano se agrega a una concentración final de 2-10% última. La proteína replegada se somete a una cromatografía en una columna de fase inversa de Poros R1/H usando una solución amortiguadora móvil de 0.1% TFA con elución con un gradiente de de 10 a 80% de cianometano. Se

analizan alícuotas de fragmentos con absorbancia de A280 en geles de poliacrilamida SDS y se agrupan fragmentos que contienen la proteína replegada homogénea. Generalmente, las especies propiamente replegadas de la mayoría de las proteínas están eluidas en concentraciones más bajas de cianometano, puesto que esas especies son las más compactas con sus interiores hidrófobos escudados de la interacción con resina de fase invertida. Las especies agregadas normalmente están eluidas en concentraciones de cianometano superiores.

Además de resolverse las formas no plegadas de proteínas de la forma deseada, la etapa de la fase inversa también remueve la endotoxina de las muestras.

Los fragmentos que contienen el polipéptido IL-17A/F replegado deseado se agrupan y el cianometano se removió usando una corriente moderada de nitrógeno dirigido a la solución. Se formulan las proteínas en 20 mM Hepes, pH 6.8 con 0.14 M de cloruro de sodio y 4% de manitol mediante diálisis o por filtración de gel usando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en la solución amortiguadora de la formulación y estéril filtrada.

EJEMPLO 5

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

Este ejemplo ilustra la preparación de una froma potencialmente glicosilada de polipéptidos IL-17A/F mediante la expresión recombinante en las células de mamífero.

El vector, pRK5 (ver la EP 307,247, publicado el 15 de
5 marzo de 1989), se emplea como el vector de expresión. Opcionalmente, el IL-17A/F ADN se liga a pRK5 con las enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN IL-17A/F usando los métodos de ligación tales como se describió en Sambrook et al., *supra*. El vector resultante se
10 llama pRK5-IL-17A/F.

En una realización, las células hospederas seleccionadas pueden ser 293 células. Las 293 células humanas (ATCC CCL 1573) se hacen crecer para la confluencia en las placas del cultivo del tejido en el medio tal como DMEM complementado
15 con el suero de ternero fetal y opcionalmente, componentes nutrientes y/o antibióticos. Aproximadamente 10 µg de pRK5-IL-17A/F ADN se mezcla con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen del ARN de VA [Thimmappaya et al., Cell, 31:543 (1982)] y se disolvió en 500 µl de 1 mM Tris-HCl, 0.1
20 mM EDTA, 0.227 M CaCl₂. A esta mezcla se agrega, por goteo, 500 µl de 50 mM HEPES (pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM NaPO₄, y un precipitado se deja formar durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspende y se añade a las 293 células y se deja conformar con aproximadamente cuatro horas a 37°C. El

medio de cultivo se aspira fuera de y 2 ml de 20% de glicerol en PBS se agrega durante 30 segundos. Las 293 células se lavan entonces con el medio libre de suero, se agrega el medio fresco y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se remueve y se reemplaza con el medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene 200 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -cisteína y 200 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -metionina. Después de una incubación de 12 horas, el medio condicionado se recolecta, se concentrado en un filtro de giro, y cargado sobre un gel de 15% de SDS. El gel procesado puede secarse y exponerse a una película durante un periodo de tiempo para revelar la presencia del polipéptido IL-17A/F. Las cultivos que contienen las células transfectadas pueden experimentar incubación adicional (en el medio libre de suero) y el medio se prueba en bioensayos seleccionados.

En una técnica alternativa, la IL-17A/F puede introducirse en 293 células usando transientemente el método de sulfato de dextrano descrito por Somparyrac et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981). Las células 293 se hacen crecer a una densidad máxima en un frasco girador y se agrega 700 μg de pRK5-IL-17A/F ADN. Las células se concentran primero del frasco girador mediante centrifugación y se

lavarón con PBS. El precipitado de ADN-dextrano se incubó en el pelletizado celular durante cuatro horas. Las células se tratan con 20% de glicerol durante 90 segundos, se lavaron con el medio de cultivo de tejido, y re-introdujeron en el
5 frasco girador que contiene el medio de cultivo de tejido, 5 µg/ml de insulina bovina y 0.1 µg/ml de transferrina bovina. Después de aproximadamente cuatro días, los medios acondicionados se centrifugan y se filtraron para quitar células y residuos. La muestra que contiene el polipéptido
10 IL-17A/F expresado pueden concentrarse y puede purificarse mediante cualquier método seleccionado, como la diálisis y/o cromatografía en columna.

En otra realización, los polipéptidos IL-17A/F pueden expresarse en las células CHO. El pRK5-IL-17A/F puede ser
15 transfectado en células CHO usando los reactivos conocidos como CaPO₄ o DEAE-dextran. Como se describe anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse, y el medio reemplazado con el medio de cultivo (solo) o medio que contiene una radioetiqueta como la 35S-metionina. Después de
20 determinar la presencia del polipéptido IL-17A/F, el medio de el cultivo puede reemplazarse con el medio libre de suero. Preferentemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días, y entonces el medio condicionado se cosecha. El medio que contiene el polipéptido IL-17A/F

expresado puede concentrarse y pueden purificarse por cualquier método seleccionado.

El IL-17A/F etiquetado con epítipo también puede expresarse en las células CHO hospederas. El IL-17A/F puede estar subclonado fuera del vector pRK5. El inserto del subclon puede experimentar PCR para fusionarse en la estructura con una etiqueta del epítipo seleccionado tal como una etiqueta poli-His en un vector de expresión Baculovirus. El inserto poli-His etiquetado IL-17A/F puede ser entonces subclonado en un vector SV40 de conducción que contiene un marcador tal como DHFR para la selección de clones estables. Finalmente, las células CHO pueden ser transfectadas (como se describió anteriormente) con el vector SV40 conductor. El etiquetado puede realizarse, como se describió anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el IL-17A/F etiquetado poli-His puede concentrarse entonces y puede purificarse por cualquier método seleccionado, tal como cromatografía de afinidad por Ni^{2+} .

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

La expresión estable en las células CHO se realiza usando el procedimiento siguiente. Las proteínas se expresan como una construcción de IgG (inmunoadhesina) en las cuales,

las secuencias de la codificación para los formas solubles (por ejemplo, dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionan a una secuencia de la región constante IgG1 que contiene la articulación, dominios CH2 y CH2, y/o como una forma etiquetada poli-His.

En seguida de la amplificación PCR, los ADNs respectivos son subclonados en un vector de expresión CHO usando las técnicas estándar como se describió en Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997). Se construyen los vectores de expresión CHO para tener sitios de restricción compatible 5' y 3' del ADN de interés para permitir la transferencia adecuada de cADN. El vector usado en la expresión en las células CHO es como se describe en Nucl. Acids Res., 24:9 (1774-1779 (1996)) y usa el promotor/mejorador SV40 temprano para conducir la expresión del cADN de interés y la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido siguiendo la transfección.

Doce microgramos del ADN del plásmido deseado se introduce en aproximadamente 10 millones de células CHO usando los reactivos de transfección disponibles comercialmente Superfect® (Qiagen), Dosper® o Fugene® (Boehringer Mannheim). Las células se hacen crecer como se describe en Lucas et. al, *supra*. Aproximadamente 3×10^7

células se congelan en una ampollita para el crecimiento adicional y producción como se describe abajo.

Las ampollitas que contienen el ADN del plásmido son descongeladas mediante la colocación en un baño de agua y mezcladas mediante un vórtice. Los volúmenes son pipeteados en un tubo de centrifugado que contiene 10 mLs del medio y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se resuspenden en 10 mL del medio selectivo (0.2 m se filtró PS20 con 5% 0.2 m de suero de feto bovino diafiltrado). Las células son entonces repartidas en un girador de 100 mL que contiene 90 mL del medio selectivo. Después de 1-2 días, las células se transfieren en un girador de 250 mL llenado con 150 mL del medio de crecimiento selectivo y se incubaron a 37°C. Después de otros 2-3 días, los giradores de 250 mL, 500 mL y 2000 mL con 3×10^5 células/mL. Los medios celulares se intercambian con los medios frescos mediante centrifugación y resuspensión en el medio de producción. Aunque cualquier medio de CHO adecuado puede emplearse, un medio de producción descrito en la Patente de E.U.A. No. 5,122,469, emitida el 16 de junio de 1992 puede usarse actualmente. Un girador de 3L de producción se cosecha a 1.2×10^6 células/mL. En el día 0, se determina el pH para el numero de células. En el día 1, el girador se prueba y se burbujea con aire filtrado. En el día 2, el girador se prueba, la temperatura se cambia a 33°C, y 30 mL

de 500 glucosa g/L y se toma 0.6 mL de 10% de antiespuma (por ejemplo, 35% de emulsión de polidimetilsiloxano, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion). A lo largo de la producción, el pH se ajusta como sea necesario para mantenerse alrededor de 7.2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad se dejara caer por debajo de 70%, el cultivo celular se cosecha mediante centrifugación y se filtra a través de un filtro de 0.22 μ m. El filtrado se guardó a 4°C o inmediatamente después es cargado sobre columnas para la purificación.

Para las construcciones etiquetadas con poli-Hiss, las proteínas son purificadas usando una columna de Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, el imidazol se agrega a los medios acondicionados a una concentración de 5 mM. Los medios acondicionados se bombean hacia una columna de 6 mL de Ni-NTA equilibrada en 20 mM de Hepes, pH 7.4, solución amortiguadora que contiene 0.3 M NaCl y 5 mM imidazol a una proporción de flujo de 4-5 mL/min. a 4°C. Después de cargar, la columna se lava con la solución amortiguadora de equilibrio adicional y la proteína se eluye con la solución amortiguadora de equilibrio que contiene imidazol 0.25 M. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en una solución amortiguadora de almacenamiento que contiene 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl y 4% manitol, pH 6.8, con 25 mL de columna G25 Superfine (Pharmacia) y se almacena a -80°C.

Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) son purificadas a partir de los medios acondicionados como sigue. El medio acondicionado se bombea hacia una columna de Proteína de 5 ml (Pharmacia) que había sido equilibrada en 20 mm de una solución amortiguadora de fosfato de Na, pH 6.8. Después de cargar, la columna se lava extensivamente con la solución amortiguadora de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mm, pH 3.5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente colectando 1 ml de fragmentos en 10 tubos que contienen 275 mL de una solución amortiguadora 1 M Tris, pH 9. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en una solución amortiguadora de almacenamiento como se describe anteriormente para las proteínas etiquetadas poli-His. La homogeneidad se evalúa por 15 gel de poliacrilamida SDS y por la secuenciación de aminoácidos en el N terminal mediante la degradación de Edman.

EJEMPLO 6

20 Expresión de IL-17A/F en Levadura

El siguiente método describe la expresión recombinante de los polipéptidos IL-17A/F en la levadura.

Primero, se construyen los vectores de expresión de levadura para la producción intracelular o secreción de IL- 25 17A/F del promotor de ADH2/GAPDH. El ADN que codifica al

polipéptido IL-17A/F y al promotor se inserta en los sitios de enzima de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular del polipéptido IL-17A/F. Para la secreción, el ADN que codifica
5 IL-17A/F puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica al promotor ADH2/GAPDH, un péptido señalado nativo IL-17A/F u otro péptido de señal del mamífero o, por ejemplo, un factor alfa de levadura o secuencia de señal/líder secretora de la invertasa, y secuencias de
10 ligadura (si se necesitan) para la expresión de IL-17A/F.

Las células de levadura, tal como la cepa de levadura AB110, pueden transformarse entonces con los plásmidos de expresión descritos arriba y cultivar en el medio de fermentación seleccionado. Los sobrenadantes de levadura
15 transformados pueden analizarse mediante la precipitación con 10% de ácido tricloroacético y separación por SDS-PAGE, seguido por el teñido de los geles con tinción de Azul Coomassie.

Los polipéptidos IL-17A/F recombinantes pueden aislarse
20 subsiguientemente y purificarse quitando las células de levadura del medio de fermentación por centrifugación y concentrado después el medio usando filtros de cartuchos seleccionados. El concentrado que contiene polipéptido IL-17A/F pueden purificarse usando las resinas de la
25 cromatografía de columna seleccionadas.

EJEMPLO 7

Expresión de IL-17A/F en Células de Insecto infectadas con Baculovirus.

El siguiente método describe la expresión recombinante
5 de polipéptidos IL-17A/F en las células del insecto
infectadas con Baculovirus.

La secuencia que codifica para IL-17A/F se fusiona
cadena arriba de una etiqueta del epítipo contenida dentro de
un vector de expresión Baculovirus. Tales etiquetas del
10 epítipo incluyen etiquetas poli-His y etiquetas de
inmunoglobulina (como regiones Fc de IgG). Una variedad de
plásmidos pueden emplearse, incluyendo los plásmidos
derivados de plásmidos disponible comercialmente como el
pVL1393 (Novagen). Brevemente, la secuencia que codifica IL-
15 17A/F o la porción deseada de la secuencia de codificación de
IL-17A/F tal como la secuencia que codifica el dominio de una
proteína extracelular de transmembrana o la secuencia que
codifica a la proteína madura si la proteína es extracelular
se amplifica por PCR con los cebadores complementarios a las
20 regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar los sitios
de enzima de restricción del flaqueo (seleccionado). El
producto se digiere entonces con esas enzimas de restricción
seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

El baculovirus recombinante se genera por la co-
25 transfección del plásmido anterior y el virus BaculoGold™

ADN (Pharmingen) en las células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) usando la lipofectina (comercialmente disponible de GIBCO-BRL). Después de los 4-5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se cosechan y se usan
5 para amplificaciones adicionales. La infección viral y expresión de la proteína se realizan como se los describió O'Reilley et al., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

El IL-17A/F etiquetado con poli-His puede purificarse
10 entonces, por ejemplo, mediante cromatografía por afinidad con Ni²⁺-quelato como sigue. Los extractos se preparan de células Sf9 infectadas con el virus recombinante como lo describió Rupert et al., Nature, 362:175-179 (1993). Brevemente, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en la
15 solución amortiguadora de sonicación (25 mL Hepes, pH 7.9; 12.5 mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA; 10% glicerol; 0.1% NP-40; 0.4 M KCl), y se sonicaron dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se clarificaron por centrifugación, y el sobrenadante se diluye con un plegado de 50 en una solución
20 amortiguadora cargada (fosfato 50 mM, 300 mM de NaCl, 10% glicerol, pH 7.8) y se filtró a través de un filtro de 0.45 mM. Una columna de Ni²⁺-NTA de agarosa (comercialmente disponible de Qiagen) se prepara con un volumen de lecho de 5 mL, se lavó con 25 mL de agua y se equilibró con 25 mL de la

solución amortiguadora cargada. El extracto celular filtrado se cargó sobre la columna en 0.5 mL por minuto. La columna se lava en la línea base A_{280} con una solución amortiguadora cargada que se inicia en cada punto de recolección del
5 fragmento. Luego, la columna se lava con una solución amortiguadora del lavado secundaria (50 mM de fosfato; 300 mM NaCl, 10% de glicerol, pH 6.0), que no eluye la proteína que no se enlaza específicamente. Después de alcanzar la línea base A_{280} , la columna se desarrolla con un gradiente de 0 a
10 500 mM de imidazol en la solución amortiguadora de lavado secundario. Un ml de los fragmentos se recogen y se analizan por SDS-PAGE y se tiñen con plata o inmunotransferencia Western con Ni^{2+} -conjugados con NTA a la fosfatasa alcalina (Qiagen). Los fragmentos que contienen el IL-17A/F etiquetado
15 con His₁₀- se agrupa y dializan contra la solución amortiguadora cargada.

Alternativamente, la purificación del IL-17A/F etiquetado con IgG (o Fc etiquetado) puede realizarse usando las técnicas de cromatografía conocidas, que incluyen por
20 ejemplo, Proteína A o cromatografía en columna de la Proteína G.

EJEMPLO 8

Preparación de anticuerpos que enlazan IL-17A/F

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden enlazar específicamente IL-17A/F.

Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas en el arte y se describen, por ejemplo, en
5 Goding, supra. Los inmunógenos que pueden emplearse incluyen polipéptidos IL-17A/F purificado, proteínas de fusión que contienen polipéptidos IL-17A/F, y células que expresan los polipéptidos recombinantes IL-17A/F en la superficie celular. La selección del inmunógeno puede hacerse por el experto en
10 el arte sin experimentación indebida.

Los ratones, tales como BALB/c, se inmunizan con el inmunógeno IL-17A/F emulsionado en el adyuvante de Freund completo y se inyectaron hipodérmicamente o intraperitonealmente en una cantidad de 1-100 microgramos.
15 Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en el adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) e inyectó en el bloque de la pata posterior del animal. Los ratones inmunizados se reforzaron entonces de 10 a 12 días posteriormente con un inmunógeno adicional emulsionado en el
20 adyuvante seleccionado. Después de esto, durante varias semanas, los ratones pueden reforzarse también con las inyecciones de inmunización adicionales. Pueden obtenerse muestras de suero periódicamente de los ratones mediante el sangrando retro-orbital por probar en ensayos de ELISA para
25 detectar anticuerpos anti-IL-17A/F.

Después de que una titulación del anticuerpo adecuado se ha detectado, los animales "positivos" para los anticuerpos pueden inyectarse con una última inyección intravenosa de IL-17A/F. De tres a cuatro días después, los ratones son sacrificados y las células del bazo se cosechan. Las células del bazo se fusionan entonces (usando 35% de polietilenglicol) en una línea celular del mieloma de murino seleccionado como P3X63AgU.1, disponible de ATCC, No. CRL 1597. Las fusiones generan células del hibridoma que pueden formarse en placas de cultivo de 96 pozos en el cultivo del tejido que contienen el medio HATO (hipoxantina, aminopterina, y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos del mieloma, e híbridos de células del bazo.

Las células del hibridoma serán separadas por exclusión en una ELISA para la reactividad contra IL-17A/F. La determinación de células del hibridoma "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra IL-17A/F está dentro de los expertos en el arte.

Las células del hibridoma positivas pueden inyectarse intraperitonealmente en ratones BALB/c singénicos para producir ascitos que contienen los anticuerpos anti-IL-17A/F monoclonales. Alternativamente, las células del hibridoma pueden hacerse crecer en frascos de cultivo del tejido en botellas de rodillo. La purificación de los anticuerpos

monoclonales producidos en los ascitos puede lograrse usando la precipitación de sulfato de amonio, seguido por la cromatografía de exclusión de gel. Alternativamente, la cromatografía de afinidad se basa luego del enlace de anticuerpo a la proteína A o proteína G puede emplearse.

EJEMPLO 9

Purificación de polipéptidos IL-17A/F usando anticuerpos específicos.

Los polipéptidos nativos o recombinantes IL-17A/F pueden ser purificados mediante una variedad de técnicas estándar en el arte de la purificación de la proteína. Por ejemplo, el polipéptido pro IL-17A/F, polipéptido maduro IL-17A/F, o polipéptido pre-IL-17A/F se purifica mediante cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos específico para el polipéptido IL-17A/F de interés. En general, una columna de inmunoafinidad se construye mediante acoplamiento covalente del anticuerpo del polipéptido anti-IL-17A/F para una resina cromatográfica activada.

Las inmunoglobulinas policlonales se preparan de suero inmune ya sea mediante precipitación con sulfato de amonio o mediante purificación en la Proteína inmovilizada A (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Igualmente, los anticuerpos se preparan a partir de fluidos de ascitos de ratón mediante precipitación de sulfato de amonio o

cromatografía en la Proteína inmovilizada A. la inmunoglobulina parcialmente purificada se une covalentemente a una resina cromatográfica tal como SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea, y la resina derivada se lava según las instrucciones del fabricante.

Tal columna de inmunoafinidad se utiliza en la purificación del polipéptido IL-17A/F preparando un fragmento de células que contienen el polipéptido IL-17A/F en una forma soluble. Esta preparación se deriva por la solubilización de la célula completa o de un fragmento subcelular obtenido vía la centrifugación diferencial por la adición de detergente o por otros métodos bien conocidos en el arte. Alternativamente, el polipéptido soluble IL-17A/F que contiene una secuencia de señal puede secretarse en una cantidad útil en el medio en el que las células crecen.

Una preparación que contiene el polipéptido soluble IL-17A/F se pasa sobre de la columna de inmunoafinidad, y la columna se lava bajo condiciones que permiten la absorción preferencial del polipéptido IL-17A/F (por ejemplo, soluciones amortiguadoras de resistencia iónica alta en presencia de detergente). Entonces, la columna se eluye bajo condiciones que dividen el enlace del polipéptido del anticuerpo/IL-17A/F (por ejemplo, una solución amortiguadora de pH bajo aproximadamente de pH 2-3, o una concentración

alta de un caotropo como urea o ion de tiocianato), y se recoge el polipéptido IL-17A/F.

EJEMPLO 10

5

Selección del fármaco

Esta invención es particularmente útil para la selección de compuestos que usan IL polipéptidos -17A/F o el fragmento de enlace en cualquiera de una variedad de técnicas de selección del fármaco. El polipéptido IL-17A/F o fragmento
10 empleados en tal prueba pueden ser ya sea libres en la solución, añadidos a un soporte sólido, afectado por una superficie celular, o localizado intracelularmente. Un método de fármaco de selección utiliza células hospederas eucarióticas o procarióticas que se transforman establemente
15 con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido o fragmento IL-17A/F. Los fármacos se separan por exclusión contra tales células transformadas en los ensayos de enlace competitivos. Pueden usarse tales células, ya sea en forma viable o fija, para los ensayos de enlace estándar.
20 Por ejemplo, se puede medir la formación de complejos entre el polipéptido IL-17A/F o un fragmento y el agente que se prueba. Alternativamente, se puede examinar la disminución en la formación del complejo entre el polipéptido IL-17A/F y su célula objetivo o receptores objetivo causados por el agente
25 que se prueba.

Así, la presente invención proporciona métodos de selección para fármacos o cualquier otro agente que puede afectar a un trastorno o enfermedad asociada con el polipéptido IL-17A/F. Estos métodos comprenden poner en
5 contacto tal agente con un polipéptido o fragmento IL-17A/F del mismo y ensayar (i) para la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido o fragmento IL-17A/F, o (ii) para la presencia de un complejo entre el polipéptido IL-17A/F o fragmento y la célula, mediante métodos bien
10 conocidos en el arte. En tales ensayos de enlace competitivos, el polipéptido IL-17A/F o fragmento se etiqueta típicamente. Después de la incubación adecuada, el polipéptido o fragmento libre IL-17A/F se separa de la forma de enlace presente, y la cantidad de etiqueta libre o no
15 formada en complejos se mide por la capacidad del agente particular para enlazar al polipéptido IL-17A/F o para interferir con el complejo del polipéptido/célula IL-17A/F.

Otra técnica para la selección del fármaco proporciona una selección de alto rendimiento para compuestos que tienen
20 afinidad de enlace adecuada a un polipéptido y se describe en detalle en la WO 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. Brevemente establecido, una gran variedad de diferentes compuestos de prueba del péptido pequeño se sintetizan en un substrato sólido, como alfileres de plástico o alguna otra
25 superficie. Como se aplicó a un polipéptido IL-17A/F, los

compuestos de prueba del péptido se hacen reaccionar con el polipéptido IL-17A/F y se lavó. El polipéptido IL-17A/F de enlace se detecta mediante métodos bien conocidos en el arte. Los polipéptidos purificados IL-17A/F también pueden
5 revestirse directamente sobre placas para uso en las técnicas de selección del fármaco antes mencionado. Además, los anticuerpos no neutralizados pueden usarse para capturar el péptido e inmovilizarlo en el soporte sólido.

Esta invención también contempla el uso de ensayos de
10 selección del fármaco competitivo que neutraliza a los anticuerpos capaz de enlazar los polipéptidos IL-17A/F compiten específicamente con un compuesto de prueba por enlazar al polipéptido o fragmentos IL-17A/F de los mismos. De esta manera, los anticuerpos pueden usarse para detectar
15 la presencia de cualquier péptido que comparte uno o más determinantes antigénicos con el polipéptido IL-17A/F.

EJEMPLO 11

Diseño Racional de Fármaco

20 La meta de diseño racional del fármaco es producir análogos estructurales de polipéptidos biológicamente activos de interés (es decir, un polipéptido IL-17A/F) o de moléculas pequeñas con la que interactúan recíprocamente, por ejemplo, agonistas, antagonistas, o inhibidores. Cualquiera de estos
25 ejemplos puede usarse para formar fármacos que son formas más

activas o estables al polipéptido IL-17A/F o qué refuerza o interfiere con la función del polipéptido IL-17A/F in vivo (c.f., Hodgson, *Bio/Technology*, 9: 19-21 (1991)).

En una metodología, la estructura tridimensional del polipéptido IL-17A/F, o de un complejo del inhibidor del polipéptido IL-17A/F, se determina por la cristalografía de radiografía, por modelación por computadora o, más típicamente, por una combinación de dos metodologías. La forma y cargas del polipéptido IL-17A/F deben determinarse para elucidar la estructura y para determinar los sitios activos de la molécula. A menudo, información útil con respecto a la estructura del polipéptido IL-17A/F puede ser ganada mediante la modelación basada en la estructura de proteínas homólogas. En ambos casos, información estructural pertinente se usa para diseñar análogos de moléculas como el polipéptido IL-17A/ o para identificar inhibidores eficaces. Ejemplos útiles del plan del fármaco racional pueden incluir moléculas que han mejorado la actividad o estabilidad mostradas por Braxton and Wells, Biochemistry, 31:7796-7801 (1992) que actúan como inhibidores, agonistas, o antagonistas de péptidos nativos como se muestra por Athauda et al., J. Biochem., 113:742-746 (1993).

También es posible aislar un anticuerpo objetivo específico, seleccionado por un ensayo funcional, como se describió anteriormente, para resolver su estructura

cristalina. Esta metodología, en principio, produce un fármaco a partir del cual puede basarse el plan del fármaco subsiguiente. Es posible desviar la cristalografía de la proteína en conjunto mediante la generación de anticuerpos anti-idiotípicos (anti-identificaciones) para un anticuerpo farmacológicamente activo funcional. Como una imagen del espejo de una imagen de espejo, se esperaría que el sitio de enlace de anti-identificación sea un análogo del receptor original. La anti-identificación podría usarse entonces para identificar y aislar los péptidos de bancos de péptidos producidos químicamente o biológicamente. Los péptidos aislados actuarían entonces como núcleo del fármaco.

En virtud de la presente invención, las cantidades suficientes del polipéptido IL-17A/F pueden estar disponibles para realizar tales estudios analíticos como cristalografía de rayos X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido IL-17A/F proporcionada en la presente proporcionará una guía para los que emplean técnicas de modelación por computadora en lugar de o además de la cristalografía de rayos X.

EJEMPLO 12

Modelos de la enfermedad *in vivo*

Los efectos de combinar anticuerpos anti-IL-17A e IL-17F como tratamiento terapéutico para las enfermedades

autoinmunes se evaluaron en modelos de ratón para la artritis reumatoide y esclerosis múltiple. Los modelos de ratón probados incluyeron modelos ratones tratados con el colágeno tipo II para inducir la Artritis inducida por el Colágeno (CIA por sus siglas en inglés) (modelo murino para la 5 artritis reumatoide (RA)) o tratada con la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) para inducir el la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) (modelo de murino para la esclerosis múltiple (MS)).

10 (1) CIA

Ratones DBA-1J de siete-ocho semanas de edad (Laboratorio Jackson; Bar Harbor, Maine) se inmunizaron con 100 µg del tipo II de colágeno bovino en 100 µl de adyuvante completo de Freund's (CFA) en el día 0. (Barck et al., 15 *Arthritis & Rheumatism*, 50: 3377-3386 (2004)) El colágeno tipo II en CFA se inyectó intradermalmente (i.d.) en la base de la cola en el lado derecho. En el día 21, 100 µg de colágeno bovino tipo II en 100 µl de adyuvante de Freund's incompleto se inyectó intradermalmente en el lado izquierdo de la cola. 20 En el día 45, los animales se distribuyeron en los siguientes grupos: (1) mAb de control del isotipo de murino IgG2a (MuIgG2a) 6 mg/kg en 100 µl de solución salina hipodérmicamente (SC) 3 veces por semana durante 7 semanas (n = 40), (2) TNFR1I-Fc murino (substituto de murine de Enbrel)

(MuTNFII-Fc) 4 mg/kg en 100 μ l solución salina + metotrexato (MTX) 3 mg/kg en 100 μ l de solución salina SC 2 veces por semana durante 7 semanas (n=40), y (3) anti-IL-17A quimérico de hámster-murino (MuAnti-IL17) y anti-IL-17F quimérico de hámster-murino (MuAnti-IL-17F) anticuerpos monoclonales (mAbs) 6 mg/kg en 100 μ l SC salina tres veces por semana durante siete semanas (n=40).

Los animales se registraron dos veces por semana empezando en el día 33 usando el método de registro de artritis estándar. El registro fue de 0-4 por pata (donde 0 significa ninguna enfermedad y 4 representa eritema y edema que involucran la pata entera) con un registro máximo de 16 registros por animal. Los animales en los grupos 1-3 de tratamiento se aleatorizaron en base al peso corporal y la enfermedad mediante el registro en el día 45. Los tres grupos de tratamiento fueron equilibrados para contener un número igual de ratones con enfermedad calmada (media de registros 0-3; 22-23 ratones por grupo de tratamiento), moderado (media de los registros 4-8; 11-13 ratones por grupo de tratamiento) y enfermedad severa (media de los registros 9 y superiores; 4-6 ratones por grupo de tratamiento). Se tomó la tomografía microcomputarizada (MicroCT) (Barck et al., *Arthritis & Rheumatism*, 50: 3377-3386 (2004)) de imágenes de

articulaciones en la terminación del estudio, en el día 81, y se calculó el Volumen del Hueso Cortical Colectivo (JCBV).

En los ratones DBA-1J los cuales se trataron con el tipo de colágeno II para inducir la Artritis inducida por el Colágeno (CIA), la combinación de los anticuerpos anti-IL-17A y anti-IL-17F (Grupo 3) resultó en registros clínicos terminales disminuidos en el día 81 cuando se compara con los registros clínicos terminales en el día 81 para ratones tratados con el unico control IgG2a (Grupo 1) ($p = 0.02$ (prueba de Dunnett; Hsu, J.C., Multiple Comparisons Theory and Methods, Chapman and Hall (1996)). Además, en los ratones DBA-1J que se trataron con el colágeno tipo II para inducir la artritis inducida por el Colágeno (CIA), el tratamiento con la combinación de anticuerpos anti-IL-17A y anti-IL-17F protegieron ratones del daño óseo medidos por un Volumen Óseo de Articulación Cortical Mayor (JCBV), ~ 4.5 para el grupo tratado anti-IL-17A e IL-17F comparado a un JCBV de ~ 3.7 en ratones tratados con el control mAb del isotipo IgG2a de murino ($p < 0.001$; prueba de Dunnett).

La capacidad de la combinación de IL-17A e IL-17F los anticuerpos para reducir las cuentas de la enfermedad clínicas terminales en los ratones con CIA y bloquear el daño del hueso en los ratones con CIA, sugiere que la combinación de IL-17A e IL-17F puede ser los blancos para el tratamiento de la enfermedad autoinmune, como la artritis reumatoide.

En un experimento similar, el tratamiento con anticuerpos anti-IL 17A solo fue adicionado al estudio creando un cuarto grupo. Los resultados se muestran en las Figuras 19 y 20. El control fue un anticuerpo isotipo-apareado anti-humano IG-2a ambrosía (Genetech, Inc.),
5 catalogado como "ambrosia" en las figuras. La calificación clínica para cada pata fue decidida usando los siguientes criterios:

- 10 0= No evidencia de eritema a inflamación
1= Eritema e inflamación suave confinada a la parte media del pie (tarsal) o tobillo
2= Eritema e inflamación suave extendida desde el tobillo hasta la parte media del pie
15 3= Eritema e inflamación moderada extendida desde el tobillo hasta las uniones metatarsales
4= Eritema e inflamación severa abarca tobillo, pie y dedos
Clasificación media = suma de la clasificación de las cuatro patas.
20 Promedio diario de clasificación clínica = promedio de la clasificación media diaria.
Clasificación clínica terminal = clasificación media en el último día del estudio.

Los datos muestran que la combinación de los anticuerpos anti-IL17A y anti-IL17F es más efectiva en una manera significativa estadísticamente que el tratamiento con un anti-IL17A solo.

5 (2) EAE

Cuatro grupos de ratones, con 15 ratones por grupo, fueron inducidos con la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) como se describió debajo y además, los grupos recibieron la siguiente dosis del anticuerpo tres veces por
10 semana después de la inducción con el antígeno del péptido MOG35-55 en CFA: (1) (Grupo 1) control mAb del isotipo IgG2a de murino (anticuerpo anti-GP120), 6 mg/kg en 100 µl de solución salina vía inyección intraperitoneal (IP), (2) (Grupo 2) anti-IL-17A quimérico hámster-murino (MuAnti-IL17)
15 mAb, 6 mg/kg en 100 µl de solución salina, vía IP, (3) (Grupo 3) anti-IL-17F quimérico hámster-murino (MuAnti-IL-17F) mAb, mg/kg de g en 100 µl de solución salina de, vía P, y (4) (Grupo 4) anti-IL-17A quimérico hámster-murino (MuAnti-IL17)
20 mAb, 6 mg/kg en 100 µl de solución salina, vía IP, y anti-IL-17F quimérico hámster-murino (MuAnti-IL-17F) mAb, 6 mg/kg en 100 µl de solución salina vía IP.

En el día antes de la inducción con MOG (Día menos 1), la dosis del anticuerpo como se describió anteriormente se administró como una primera dosis. En el día de la inducción

con MOG (Día 0), se inmunizaron los ratones intradermalmente con 200 µl de emulsión, que contenía 200 µg de péptido MOG35-55 (Liu et al., *Nat. Med.*, 4(1): 78-83 (1998); Suen et al., *J. Exp. Med.*, 186(8): 1233-40 (1997)) en 100 µl de PBS y 100
5 µl de CFA que se preparó mezclando el Adyuvante de Freund Incompleto (IFA) con *M. tuberculosis* H37A (muerto y desecado) a la concentración de *M. tuberculosis* en CFA de 2 mg/ml (200 µg de *M. tuberculosis* por ratón). Los ratones se inyectaron además con 200 ng de Toxina de la Pertusis en 100 µl de PBS
10 vía IP.

En el día 2, los ratones se inyectaron además con 200 ng de Toxina de Pertusis en 100 µl de PBX vía IP.

Para el resto del estudio, se administraron a los ratones las dosis del anticuerpo como se describió arriba
15 tres veces por semana.

Los ratones se evaluaron para la enfermedad clínica usando el método de registro de esclerosis múltiple (descrito debajo) por lo menos tres veces por semana que empieza en el Día 1. Además, los ratones que alcanzaron el grado de la
20 enfermedad de 4 se evaluaron diariamente (si los animales de 4 grado no se remiten al grado 3 o menos en 5 días, se aplica la eutanasia a los animales). Además, los linfocitos en la médula espinal y el cerebro se evaluaron al final del estudio. El método de registro de esclerosis múltiple se

evaluó usando el siguiente sistema de graduación: (1) el grado 0 representa el ratón normal sin señales directas de enfermedad, (2) grado 1 representa la cola flácida (cola flácida se describe como flacidez completa de la cola y ausencia de rizado en la punta de la cola cuando se recoge el ratón) o debilidad del miembro posterior (debilidad del miembro posterior se describe como el andar de panza con una señal objetiva de que camina, miembros posteriores del ratón a través de la parte superior de la jaula de alambre) pero no ambos, (3) grado 2 representa la cola flácida y la debilidad del miembro posterior, (4) grado 3 representa la parálisis del miembro posterior parcial (parálisis del miembro posterior parcial se describe como cuando un ratón es incapaz de usar los miembros posteriores para mantener la postura de anca o para caminar pero todavía puede mover uno o ambos miembros a algunos para extenderse), (5) grado 4 representa la parálisis del miembro posterior completa (parálisis del miembro posterior completa se describe como la pérdida completa de movimiento en los miembros posteriores con el ratón que sólo se arrastra con sus miembros posteriores) y (6) grado 5 representa el estado moribundo y muerte por EAE (eutanizadas por razones humanas).

En ratones con glicoproteínas oligodendrocitos de mielina (encefalomielitis alérgica experimental inducida por MOG) (EAE), la combinación de anticuerpos anti-IL-17A y anti-

IL-17F (Grupo 4) resultó en registros clínicos terminales en el día 34 cuando se comparó con los registros clínicos terminales en el día 34 para ratones tratados con gp120 (Grupo 1) ($p < 0.01$ (prueba de Dunnett). Cualquier anti-IL-17A (Grupo 2) o anti-IL-17F (Grupo 3) únicamente no fueron eficaces en los registros clínicos disminuidos como en ambos anti-IL-17A y anti-IL-17F en combinación. Los resultados de los modelos MOA y CIA sugieren que el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (RA) y esclerosis en placas (MS) puede requerir el bloqueo de ambas sendas IL-17A e IL-17F en combinación.

La capacidad de la combinación de los anticuerpos IL-17A e IL-17F para reducir los registros de enfermedades clínicas terminales en los ratones con EAE inducido por MOG, sugiere que la combinación de IL-17A e IL-17F puede ser objetivos para el tratamiento para enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple. La combinación del tratamiento de direccionamiento de IL-17A e IL-17F puede incluir anticuerpos específicos duales/reactivos cruzados (anticuerpos que reconocen epítomos idénticos o similares presentes en ambos IL-17A e IL-17F basados en la homología de la secuencia u homología de la estructura como se describió en el Ejemplo 15), los anticuerpos bi-específicos (anticuerpos que se han diseñado para reconocer ambos IL-17A e IL-17F, por ejemplo un brazo del anticuerpo que reconoce IL-17A con el otro brazo

del mismo anticuerpo que reconoce IL-17F o la cadena pesada del anticuerpo que reconoce IL-17A con la cadena ligera del mismo anticuerpo que reconoce los anticuerpos IL-17F) e IL-17A + IL-17F administrados en la combinación (dos anticuerpos, uno que reconoce IL-17A y otro que reconoce IL-17F).

EJEMPLO 13

Activación de la célula T in vitro

10 El linaje auxiliador T, Th_{IL-17} que es distinto de Th1 y Th2 (Ver la solicitud Americana No. 10/697,599, US2004/0156849, archivada el 10/29/03), y que produce IL-17, se estimula por IL-23 (Hunter, et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 5:521-531 (2005); Holscher et al., *Curr. Opin. Invest. Drugs*, 15 6: 489-495 (2005)) así como otras citoquinas, tales como IL-6 y TNF (Veldhoen M et al., *Immunity*, 24:179-89 (2006)). Para determinar el nivel de producción de IL-17A e IL-17F en las células de Th_{IL-17}, las células T se activaron con IL6 y TGF y los niveles de IL-17A e IL-17F se cuantificaron por el análisis de PCR.

Las células T CD4⁺CD62L⁺CD25⁻CD44^{hi} sin tratar purificadas por FACS (> 99% pureza) (una población de células T CD4⁺ sencillas) se incubaron durante 48 horas en una placa cubierta con CD3 (anticuerpo anti-CD3). Las citoquinas 25 (incluyendo IL-6, IL-27 y TGF) y CD28 (anticuerpo anti-CD28)

se agregaron en la solución como sigue en los siguientes grupos: (1) ninguna citoquina, (2) IL-6, (3) IL-27, (4) IL-6 + IL-27), (5) IL-6 + TGF o (6) IL-6 + TGF + IL-27. La expresión de IL-23R, IL-17A, e IL-17F se determinaron por el análisis de PCR cuantitativo y normalizado para rpl19. (¿que es rpl19?) La inducción del pliegue se calculó normalizando la expresión para la expresión medida en las células purificadas por FACS previo a la estimulación.

En la activación de células T in vitro mediante IL-6 y TGF resultó en una producción aumentada de IL-17A (~ 18,000 inducción de pliegue) e IL-17F (~ 300,000 para la inducción del pliegue) (Grupo 5) cuándo se comparó con la activación sin tratamiento (Grupo 1), solo IL-6 (Grupo 2), solo IL-27 (Grupo 3), IL-6 + IL-27 (Grupo 4), e IL-6 + TGF + e IL-27 (Grupo 6) (Figura 13).

Los resultados que IL-6 y TGF- β inducen la producción de ambos IL-17A e IL-17F en combinación con los resultados in vivo del Ejemplo 12, sugiere que el tratamiento eficaz de enfermedades autoinmune, como la artritis reumatoide y esclerosis múltiple, bloqueando la función de células ThIL-17, incluye la inhibición de ambos IL-17A e IL-17F. El tratamiento de combinación de direccionamiento IL-17A e IL-17F puede incluir anticuerpos dual-específicos/reactivos cruzados (anticuerpos que reconocen a los epítomos idénticos o similares presentes en ambos IL-17A e IL-17F basados en la

homología de la secuencia u homología de la estructura como se describió en el Ejemplo 15), los anticuerpos bi-específicos (anticuerpos que se han diseñado para reconocer ambos IL-17A e IL-17F, por ejemplo un brazo del anticuerpo que reconoce IL-17A con el otro el brazo del mismo anticuerpo que reconoce IL-17F o la cadena pesada del anticuerpo que reconoce IL-17A con la cadena ligera del mismo anticuerpo que reconoce IL-17F) e IL-17A + los anticuerpos IL-17F administrados en combinación (dos anticuerpos, uno que reconoce IL-17A y otro que reconoce IL-17F.

EJEMPLO 14

Identificación de Interacciones del Receptor/Ligando -
Introducción al ensayo de selección de Polipéptidos PRO para
la Identificación de Interacciones del Receptor/Ligando.

En este ensayo, varios polipéptidos PRO se prueban para la capacidad de enlazar a un panel de receptor potencial o moléculas del ligando con el propósito de identificar las interacciones del receptor/ligando. La identificación de un ligando para un receptor conocido, un receptor para un ligando conocido o un nuevo par de receptor/ligando es útil para una variedad de indicaciones que incluyen por ejemplo, direccionamiento de moléculas bioactivas (enlazadas al ligando o receptor) a una célula conocida por expresar el

receptor o ligando, el uso del receptor o ligando como un reactivo para detectar la presencia del ligando o receptor en una composición sospechosa de contener el mismo, en donde la composición puede comprender células sospechadas de expresar el ligando o receptor, modulando el crecimiento de u otra actividad biológica o inmunológica de una célula conocida por expresar o responder al receptor o ligando, modulando la respuesta inmune de células o hacia células que expresan el receptor o ligando, permitiendo la preparación de agonistas, antagonistas y/o anticuerpos dirigidos contra el receptor o ligando que modularán el crecimiento o una actividad biológica o inmunológica de una célula que expresa al receptor o ligando, y otras indicaciones que serán fácilmente aparentes para el artesano ordinariamente experimentado.

En general, el ensayo se realiza como sigue. Un polipéptido PRO de la presente invención sospechoso de ser un ligando para un receptor se expresa como una proteína de fusión que contiene el dominio Fc IgG humano (una inmunoadhesina). El enlace del receptor-ligando se detecta permitiendo la interacción del polipéptido de inmunoadhesina con las células (por ejemplo, células Cos) que expresa los receptores del polipéptido PRO candidato y visualización de inmunoadhesina de unión con los reactivos fluorescentes dirigidos hacia el dominio de fusión Fc y examinación mediante microscopio. Las células que expresan los receptores

candidato son producidas por transfección transitoria, en paralelo, de subconjuntos definidos de una colección de vectores de expresión cADN que codifican polipéptidos PRO que pueden funcionar como moléculas del receptor. Las células se incuban durante 1 hora en presencia de inmunoadhesina del polipéptido PRO que se prueba para un enlace posible del receptor. Las células se lavan entonces y se fijan con paraformaldehído. Las células se incuban entonces con un anticuerpo conjugado fluorescente dirigido contra la porción Fc de inmunoadhesina del polipéptido PRO (por ejemplo FITC conjugado con el anticuerpo de cabra anti-humano-Fc). Las células se lavan entonces nuevamente y se examinaron por el microscopio. Una interacción positiva se juzga mediante la presencia de etiquetado fluorescente de células transfectadas con cADN que codifica a un receptor del polipéptido PRO particular o depósito de receptores y una ausencia de etiquetado fluorescente similar de células semejantemente preparadas que han sido transfectadas con otros cADN o depósitos de cADN. Si un depósito definido de vectores de expresión de cADN se juzga para ser positivo, para la interacción con una inmunoadhesina del polipéptido PRO, se prueban las especies del cADN individuales que comprenden el depósito individual (el depósito está "fracturado") para determinar el cADN específico que codifica a un receptor

capaz de interactuar recíprocamente con la inmunoadhesina del polipéptido PRO.

En otra realización de este ensayo, el polipéptido Pro del ligando potencial etiquetado con el epítipo (por ejemplo, etiqueta de 8 histidinas "His") se permite interactuar con un panel de las moléculas del polipéptido Pro del receptor potencial que se han expresado como fusiones con el dominio Fc del IgG humano (inmunoadhesinas). Siguiendo una co-incubación de 1 hora con el polipéptido PRO etiquetado con el epítipo, los receptores del candidato son cada uno inmunoprecipitados con perlas de proteínas A y las perlas se lavaron. La interacción del ligando potencial se determina mediante el análisis de inmunotransferencia Western de complejos inmunoprecipitados con el anticuerpo dirigido hacia la etiqueta del epítipo. Se juzga una interacción que ocurre si una banda de peso molecular anticipado de la proteína etiquetada con el epítipo se observa en el análisis de inmunotransferencia Western con un receptor del candidato, pero no se observa para ocurrir con los otros miembros del tablero de receptores potenciales.

Usando los ensayos descritos anteriores, se han identificado las siguientes interacciones del receptor/ligando en la presente:

(1) PRO1031 (designado en la presente como el ligando humano IL-17B) enlaza a PRO5801 (designado en la presente como el receptor humano IL-17RH1).

(2) PRO10272 (designado en la presente como el ligando humano IL-17E) enlaza a PRO5801 (designado en la presente como el receptor humano IL-17RH1).

(3) PRO20110 (designado en la presente como el ligando humano IL-17F) enlaza al receptor (IL-17R) del IL-17 humano [(Yao et al., Citokine, 9(11):794-800 (1997); también en la presente designado como PRO1] y a PRO20040 (designado en la presente como el receptor IL-17RH2 humano).

(4) PRO1031 (ligando IL-17B) y PRO1122 (ligando IL-17C) no enlaza al receptor IL-17 humano (Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 97(2):773-778 (2000)).

15

EJEMPLO 15

Enlace del Receptor IL-17F; Determinación de la Estructura

IL-17F

A. Métodos

20 B. (1) Mediciones de Enlace

La cinética y afinidad de IL-17, IL-17E (PRO10272), o IL-17F (PRO20110) que enlaza a IL-17R o IL-17RH1 (PRO5801) se determinó por las mediciones SPR en un instrumento de Pharmacia BIAcore 1000 (Pharmacia Biosensor, Piscataway NJ).
25 El ligando o receptor IL-17 se inmovilizaron sobre una célula

de flujo de un chip de sensor CM5 vía el acoplamiento aleatorio a los grupos amino, química de N-hidroxisuccinimida, usando un protocolo desarrollado por el fabricante. Un nivel de la inmovilización de aproximadamente 5 500 unidades de resonancia (RU) se obtuvo para IL-17R, IL-17RH1, y IL-17F, considerando que los niveles de IL-17 e IL-17E fueron 1200 y 1500 RU, respectivamente. Una señal fuerte se obtuvo para el enlace IL-17R para inmovilizar a IL-17. Sin embargo, cuando IL-17R se inmovilizó, sólo una señal débil se 10 obtuvo para el enlace IL-17 sugiriendo que la inmovilización del receptor vuelve inactivo el sitio de enlace. Después de bloquear los sitios no reactivos con etanolamina, se realizaron mediciones de enlace usando una proporción de flujo de 25 ml/min. Se obtuvieron sensogramas para una serie 15 de seis soluciones de la proteína diluidas en forma consecutiva de dos pliegues. La concentración más alta usada fue una proteína de 1000 o 500 nM y las soluciones se prepararon en la solución amortiguadora de ejecución, PBS que contiene 0.05% Tween-20. La superficie del chip sensor se 20 regeneró entre los ciclos de enlace mediante la inyección de una alícuota de 25 ml de 0.1 M de ácido acético, 0.2 M de NaCl, pH 3 para eluir la proteína enlazada no covalente. Se evaluaron los sensogramas de acuerdo con un modelo de enlace de 1:1 mediante un análisis de regresión no lineal usando el 25 software proporcionado por el fabricante. En los experimentos

separados para medir la competición entre las variantes IL-17 para los receptores de enlace, una concentración fija del receptor se incubó con una concentración variada de la proteína IL-17 seguida por la inyección de esta mezcla sobre una célula de flujo que tiene una proteína inmovilizada IL-17. La cantidad del receptor ligado se determinó a partir de la señal de resonancia obtenida después de la realización de la fase de asociación.

(2) Cristalografía

La IL-17F cristalizada como placas hexagonales en gotas caídas sobre una solución en pozos que contiene 1.0 M de sulfato de litio, 0.5 M de sulfato de amonio, 1% etanol, y 100 mM de citrato de sodio, pH 5.6, a 19 ° C. Los cristales se cosecharon en un licor madre artificial que consistió de la solución adecuada sin etanol. Antes de la recolección de datos, se sumergieron los cristales en el licor madre artificial con 20% de glicerol y nitrógeno líquido de enfriamiento rápido. Los datos iniciales se congregaron en un generador de ánodo de giro interno con radiación $\text{CuK}\alpha$ y el grupo espacial se encontró ser de P61 o P65, con dos dímeros en la unidad asimétrica. Para la formación de fases, los cristales se derivaron mediante un empapado de 6 hr en el licor madre artificial suplementado con 2 mM de timersol. Un conjunto de datos nativo y tres experimentos de longitudes de onda Hg MAD (Difracción Anómala de múltiples longitudes de

onda) se recogieron en la línea 9-2 en el laboratorio de Radiación por Sincrotron de Stanford. El conjunto de datos se procesaron usando los programas en el paquete HKL (Otwinowski, Z., and Minor, W., Methods Enzymol. 176:307-326 (1997)). La determinación de la estructura se llevó a cabo usando la colección de CCP4 de programas (CCP4, Acta Cryst. D50:760-763 (1994)). Los mapas de Patterson indicaron la presencia de varios átomos Hg cuya bien ordenados cuya ubicación se determinó usando el programa Rantan. El refinamiento de la fase se llevó a cabo con MLPHARE. El examen de mapas modificados con DM indicó que el grupo espacial fue $P6_5$ y reveló operadores de simetría no cristalográfica (NCS). Cada protómero se enlazó aun solo timerosal en un sitio relacionado NCS equivalente.

La estructura inicial se construyó en un mapa experimental uniformizado con solvente y promediado con NCS de cuatro pliegues y se refinó usando los programas REFMAC_4.0 (CCP4, Acta Cryst. D50:760-763 (1994)) and Brünger, A. T. (1992), X-PLOR Manual, Version 3.1 (New Haven, Connecticut: Yale University) modificado por Molecular Simulations, Inc. Las reflexiones separadas para calcular el valor R libre se eligieron en envolventes de resolución delgadas. Una función objetivo de probabilidad máxima, una corrección anisotrópica global, y una corrección solvente del volumen real-espacial se usaron durante el refinamiento

posicional, formación de pares estimulados y refinamiento del factor de temperatura isotrópico. El refinamiento inicial se hizo contra los datos remotos $2.65 \text{ \AA}$ establecidos pero el desorden alrededor de los sitios Hg demostraron una dificultad para el refinamiento final del modelo que se llevó a cabo contra el conjunto de datos nativos $2.85 \text{ \AA}$, usando el mismo conjunto de reflexiones R libres. En el modelo final, los cuatro residuos derivados del vector, residuos 1 a 8, y residuos 128-133 se desordenaron en los protómeros A, B y X, mientras que los residuos 1-6 y 130-133 se desordenaron en el protómero Y. En el dímero XY, una vuelta interior (residuos X20-X23 y Y20-Y25) se trastornaron; esta misma vuelta se ordena pobremente en los monómeros AB. Un plano de Ramachandran muestra que 90% de todos los residuos sin glicina, sin prolina están en las regiones más favorecidas, 9.2% en las regiones permitidas adicionales, 0.7% (3 residuos) en las regiones generosamente permitidas, y ningún residuo en las regiones desaprobadas. La colección de datos y estadística de refinamiento en la Tabla 8. Las coordenadas para IL-17F se han depositado en el Banco de Datos de Proteínas y código de acceso para ser asignadas. Los programas areaimol y resarea (CCP4, Acta Cryst. D50:760-763 (1994)) se usaron para los cálculos de área de superficie accesibles. Los programas Molscript (Kraulis, P., J., J.

Appl. Cryst. 103:1345-1352 (1999)); Raster3D (Merrit, E., A., y Murphy, M., E. P., Acta Cryst. D50:869-873 (1994)); Insight97 (MSI) y Agarro (Nichols et al., Proteins 11:281-296 (1991)) se usaron para el análisis y para hacer las figuras
5 15, 17 y 18.

B. Resultados y Discusión

(1) Enlace del receptor

La resonancia de la superficie del plasmon (SPR) se usó para determinar si IL-17F (PRO20110) enlaza a los dominios
10 extracelulares (ECDs) ya sea de los dos receptores IL-17R (designados PRO1) e IL-17RH1 (PRO5801) reportados para enlazar las proteínas IL-17. Sin embargo, ningún enlace IL-17R o IL-17RH1 (hasta 1 y 0.5 mM, respectivamente) se observó para inmovilizar IL-17F. En contraste, el IL-17R enlazado
15 inmovilizó IL-17 con una afinidad de enlace modesta (ver la Tabla 8 debajo), consistente con los reportes previos en la afinidad para esta interacción (Yao et al., Citokine 9:794-800 (1997)). Igualmente, IL-17RH1 mostró afinidad alta de enlace para IL-17E (Tabla 7), consistente con la potencia
20 observada para la inducción de IL-8 liberada de células (Lee et al., J. Biol. Chem. 276:1660-1664 (2001)). Además, ningún enlace se observó entre IL-17RH1 e IL-17 y entre IL-17E e IL-17R como se esperaba (Shi et al., J. Biol. Chem. 275:19167-19176 (2000); Lee et al., J. Biol. Chem. 276:1660-1664 (2001)).
25

Para probar si la falta de IL-17R o IL-17RH1 que enlaza a IL-17F podría ser el resultado de la activación enlazada a inmovilización, el enlace del receptor IL-17F se probó en experimentos de competición. En estos experimentos, una
5 concentración fija de IL-17R (500 nM) o IL-17RH1 (31 nM) se incubó con una concentración variada del ligando, y entonces se inyectó sobre la superficie de IL-17 o IL-17E. Mientras el IL-17 soluble podría bloquear eficazmente el enlace de IL-17R para inmovilizar a IL-17, no se observó ninguna competición
10 con 2 M IL-17F. Además, 1.3? M IL-17F no podría bloquear el enlace de IL-17RH1 para inmovilizar IL-17E, aunque el enlace se inhibió completamente mediante el IL-17E soluble. Estos resultados indicaron que IL-17F no enlaza con afinidad alta para el ECD purificado, monomérico, de o IL-17R o IL-17RH1.
15 Como se muestra en el EJEMPLO 14 (Figura 14), el ligando IL-17F ha demostrado enlazar al nuevo receptor IL-17RH2 (PRO20040).

Aunque IL-17F parece tener la actividad relacionada a IL-17, IL-17F no enlaza IL-17R con afinidad alta in vitro.
20 Sin embargo, el enlace mejorado de IL-17F a las células Cos transfectadas con IL-17R puede detectarse (no se muestra), sugiriendo que IL-17F puede ser capaz de utilizar IL-17R, pero sólo en combinación con adicionalmente, aún los componentes no identificados para formar un complejo de
25 señalización de afinidad alta. Un mecanismo similar se ha

postulado para IL-17 para explicar la diferencia entre la afinidad del receptor y la potencia de su actividad biológica (Yao et al., Cytokine 9:794-800 (1997)). Los resultados presentados en la presente sugieren que sin tomar en cuenta el receptor(s) involucrado, la señalización de IL-17F resulta en actividades en dirección descendente similares como la estimulación de IL-17R por IL-17.

Tabla 8

10 Cinética y Afinidad del Receptor que enlaza a IL-17 e IL-17E
Inmovilizados

Proteína Inmovilizada	Ligando	$K_{\text{activ}} \times 10^{-5}$ ($M^{-1} s^{-1}$)	$K_{\text{inactiv}} \times 10^4$ (s^{-1})	Kp (nM)
IL-17	IL-17R	0.093	6.7	72
15 IL-17E	IL-17RH1	6.7	7.0	1.1
IL-17RH1	IL-17E	4.3	6.2	1.4

(2) Determinación de la Estructura de IL-17F

La estructura del IL-17F de humano se resolvió por los métodos de difracción anómalos de múltiples longitudes de onda Hg y se refinó a un R_{libre} y R_{cristal} de 28.8% y 23.3%, respectivamente, a una resolución de 2.85 (ver la Tabla 9 debajo). El centro de un protómero IL-17F está compuesto de dos pares de hebras β antiparalelas; un par incluye hebras 1 (residuos 52-59) y 2 (residuos 66-73 y 77-79), mientras que

los otros incluye hebras 3 (89-103) y 4 (110-125). La hebra 2 se interrumpe por un estiramiento corto de la estructura irregular β . Dos puentes de bisulfuro (Cys 72/Cys 122 y Cys 77/Cys 124) conectan a las hebras 2 y 4. Un tercer bisulfuro
5 (Cys 17/Cys 107) conecta la vuelta entre las hebras 3 y 4 de un protómero a la extensión terminal N del protómero adyacente formando contactos con el dímero extensivo (como se discute adelante). Esta extensión en el en el N terminal también contiene una hebra β (hebra 0, residuos 25-32) cuyos
10 enlaces de hidrógeno a la hebra 3' sobre el otro protómero, y pequeñas espirales α (residuos 43-48). Se observó una densidad adicional del electrón en Asn 53, consistente con la glicosilación de este residuo como se esperaba a partir de la secuencia de análisis y caracterización de la proteína
15 purificada.

Esta estructura revela que IL-17F es un homólogo distante de la familia del nudo de la cistina de proteínas (McDonald, N., Q., y Hendrickson, W., A., Cell 73:421-424 (1993)), nombrada por su inusual conectividad de cistina
20 (Figura 15). El nudo de la cistina se caracteriza por dos conjuntos de hebras- β apareadas (hebra 1 y 2 y hebras 3 y 4) que están conectadas mediante enlaces de bisulfuro entre las hebras 2 y 4 (Figura 15A, intercalada). Un tercer puente de bisulfuro pasa a través de este macro-ciclo para conectar las
25 hebras 1 y 3. En contraste, IL-17F contiene sólo dos de los

tres enlaces de cistina distintivas que le dan su nombre a la familia. En IL-17F, los bisulfuros Cys 72/Cys 122 y Cys 77/Cys 124 forman el macro-ciclo del nudo de la cistina típica. El tercer bisulfuro que formaría el "nudo" 5 atravesando este macro-ciclo no se presenta; en cambio, los residuos 50 y 89, que se localizan en el mismo espacio tridimensional como el tercer bisulfuro en las proteínas con nudo de cistina, son las serinas en IL-17F. Mientras Ser 50 está en la misma estructura como la cisteína correspondiente 10 en un nudo de la proteína, Ser 89 no lo es. Es notable que las serinas se conservan en estas posiciones en todos los miembros de la familia IL-17 (ver la Figura 16), a pesar del hecho de que la estructura sugiere que el tercer bisulfuro podría acomodarse.

15

Tabla 9

Estadísticas Cristalográficas

20

Recolección de datos y Fase de MAD

25

		Nativo	Pico Hg	Inflexión Hg	Remoto Hg
	Grupo de Espacio	P6 ₅			
	Constantes de célula unitaria (Δ)	a=126.4, b=89.9	a=126.8, b=90.0		
	Longitud de Onda (Δ)	0.979	1.0067	1.0087	1.127
5	Resolución (Δ)	2.85	2.8	2.8	2.65
	I/Isig	7.7	11.4	11.2	9.1
	Terminación (%)	100 (100)	98.9 (91.3)	98.8 (90.2)	99.9 (99.9)
	Rsim ^b	8.8 (54.1)	5.8 (34.4)	5.9 (35.9)	6.4 (43.1)
	Reflexiones medidas ^c	141778	228788	228553	266735
	Reflexiones particulares ^c	19294	40450	40459	46851
	Potencia céntrica de fase ^d	-	1.4	1.6	1.3
10	Potencia acéntrica de fase ^d	-	4.3	3.2	4.3
	Rcullis acéntrico ^d	-	0.76	0.7	0.8
	Refinación				
	Resolución (Δ)	30-2.85			
	# Reflexiones	19246			
	R ^c	0.233			
	R _{libre}	0.288			
15	# átomos de proteínas	3716			
	# átomos de carbohidratos	84			
	3 Waters	21			
	Enlaces Rmsd (Δ)	0.12			
	Bs enlazado Rmsd	4.5			
	Ángulos Rmsd (E)	1.7			

Los números en paréntesis se refieren a un escudo de resolución más alta

20 ^b $R_{sym} = \frac{\sum I_0 - \langle I \rangle}{\sum I_0}$ es la intensidad promedio de la simetría relacionada con las observaciones de una única reflexión.

^c Las reflexiones de Bijvoet se mantienen separadas en el Hg estadístico

^d Las estadísticas de fase son para las reflexiones con $F > 2\sigma$

^e $R = \frac{\sum |F_o - F_c|}{\sum F_o}$

25

(2) Dimerización

IL-17F dimeriza en forma paralela y similar a un factor de crecimiento del nervio (NGF) y otras neurotrofinas (McDonald et al., Nature 354:411-414 (1991)). Sin embargo, la interfaz del dímero es extraordinariamente grande, ocultando un total de 6800 Å² (o ~3400 Å² por monómero) comparado con 3400 Å² total (~1700 Å² por monómero) para NGF (PDB código 1WWW; Weismann et al., Nature 401:184-188 (1999)). Aproximadamente un tercio de la interfaz se forma por las interacciones entre las hebras 3 y 4 de un monómero con las mismas hebras en el otro monómero, análogos a la interfaz del dímero vista en las neurotrofinas. Único a IL-17F, es la vasta cantidad de área de superficie reservada por interacciones que involucran la extensión en el N terminal (residuos 8-48) de cada protómero alcanzando la interfaz canónica del dímero y comprimiendo contra varias porciones del otro protómero.

La estructura completa de la columna del dímero IL-17F puede describirse como una vestimenta en donde las hojas ½ y 1½ forman las mangas, la línea de bisulfuros del nudo de la cistina, el cuello, y las hojas ¾ y ¾' junto con las extensiones en el N terminal del cuerpo, que se termina con las dos hojas de tres hebras (que involucran hebras 4/3/0' y 0/3'/4') formando una falda en el fondo (Figura 15B; dimensiones 65 x 25 x 30 Å). Una característica llamativa en

la superficie de la molécula es una cavidad extraordinariamente grande (18 x 10 x 10 de profundidad) localizada en la interfase del dímero esencialmente posicionada como los bolsillos en la vestimenta. La base de la cavidad se forma por los residuos en las hebras 3 y 3' (Gln 95, Glu 96, Trp 97, y Leu 98 de ambas cadenas) y 4 y 4' (Lys 115', Val 118, y Val 120'). Los residuos en la línea en el N terminal a un lado de la cavidad (residuos Arg 37, Val 38, Met 40), mientras el otro lado está alineado por los residuos de hebra 1 (Tyr 54), hebra 2 (Val 68, Glu 66), y el giro entre estas hebras (Tyr 63 y Pro de 64). El enlace del péptido entre Tyr 63 y Pro 64 es una inusual estructura de cis. Debido a que esta prolina se conserva en todas las secuencias IL-17 y siempre procede por un gran residuo hidrófobo (ver la Figura 16), es improbable que este enlace del péptido está en una conformación cis en todos los miembros de la familia IL-17. El compuesto que contiene mercurio, timerosal que fue usado para escalonar la estructura, se enlaza en el extremo inferior de esta cavidad (como se orienta en la Figura 17), ocupando 30% del espacio.

Las características estructurales discutidas arriba demuestran que un homólogo IL-17 (IL-17F) es un miembro del pliegue del nudo de la superfamilia de la cistina y dimerizan similarmente a los miembros de la subfamilia NGF. Las proteínas IL-17 comparten similitud de la secuencia

despreciable con otros miembros de la superfamilia. Por ejemplo, una alineación de la secuencia basada en la estructura de IL-17F con NGF revela la identidad para sólo diez residuos, incluyendo las cuatro cisteínas conservadas en la porción del nudo de la cistina (no se muestra). La conservación de la secuencia limitada es típica de la superfamilia de pliegue del nudo de la cistina (McDonald, N., Q., y Hendrickson, W., A., Cell 73:421-424 (1993)).

La estructura de IL-17F permite la generalización a otros miembros de la familia IL-17. El pliegue del nudocistina que incluye la ubicación de las hojas β y enlaces de bisulfuro del macro-ciclo debe ser preservado en todos los homólogos IL-17 (Figura 16). En particular, IL-17 es similar a IL-17F, compartiendo casi 50% de la identidad de la secuencia, que es posible predecir cuando IL-17 e IL-17F compartirá las características de la superficie y donde ellos divergirán. La Figura 17 muestra la superficie molecular de IL-17F coloreada de acuerdo con la identidad de la secuencia IL-17. Los únicos parches conservados extensivos en la superficie de IL-17F están sobre la cara plana de cada protómero, (Figura 17B) y en el área de la cavidad "arriba" (Figura 17A). El área conservada en la cara del protómero puede representar cualquiera de las características de conservación requeridas para mantener la estructura o para el reconocimiento potencial de los compañeros de enlace común.

La gran cavidad en la superficie de IL-17F, aunque se espera que también este presente en IL-17, pero se esperaría que este compuesta de ambos residuos conservados y variables.

En contraste, las secuencias de IL-17B, IL-17C, e IL-17E
5 divergen significativamente de IL-17F e IL-17, especialmente en el número y ubicación de enlaces de cistina auxiliar y la longitud y secuencia de la extensión en el N terminal. A pesar de esta divergencia, es posible hacer varias predicciones acerca de la conectividad del bisulfuro y el
10 efecto que tendrá la extensión en el en el N terminal en otros miembros de la familia. Por ejemplo, IL-17B se secreta como un dímero no covalente (ambos CHO o células de insecto (Shi et al., J. Biol. Chem. 275:19167-19176 (2000) y datos no mostrados) indicando todos los ocho residuos de la cisteína
15 que se aparean dentro de una sola cadena del dímero. Una de las dos cisteínas adicionales en IL-17B (Cys 103) se localiza entre las dos cisteínas en la hebra 2 que está envuelto en el macro-ciclo mientras la segunda cisteína adicional está en la vuelta entre las hebras 3 y 4 (Figura 16 y Figura 15). Basado
20 en la suposición de que el nudo del pliegue de la cistina se conserva en todos los homólogos IL-17, la cisteína extra (Cys 103) en la hebra 2 de IL-17B se localizaría muy lejos para unir a ambas de las cisteínas en la vuelta de la hebra 3/4. Por consiguiente, Cys 103 de IL-17B debe enlazarse mediante
25 el bisulfuro a Cys 64 en la extensión en el N terminal,

dejando las dos cisteínas en la vuelta de la hebra 3/4 para unir a cada una entre si. Para que estas interacciones tengan lugar, la extensión en el N terminal debe estar en una estructura diferente en IL-17B que en IL-17F. Esto es
5 razonable ya que la secuencia en esta parte de la estructura no se conserva a través de la familia, forma una estructura secundaria muy regular y se comprime principalmente en la periferia de la molécula. Basado en este análisis, se espera que IL-17C e IL-17E que también posee una cisteína extra en
10 la hebra 2 también es probable que tenga su N-termino en las conformaciones significativamente diferentes de aquellas para IL-17F e IL-17. Este análisis divide a la familia en dos clases basadas en el patrón de enlaces de bisulfuro del N-termino.

15 Una característica impresionante de la estructura de IL-17F es la extraordinariamente gran cavidad formada por los residuos en la interfaz del dímero (Figura 18) que sugiere una región que podría enlazar a otra molécula. La cavidad (dos por dímero) está compuesta de una combinación de
20 residuos que se conservan estrictamente o siempre poseen un carácter químico similar (Tyr 54, Tyr 63, En pro de 64, Val 120), así como otros entre son extremadamente variables entre los miembros de la familia IL-17 (Arg 37, Val 38, Met 40, Ala 95) proporcionando potencial para impartir especificidad para
25 las interacciones intermoleculares. La cavidad no tiene una

característica de superficie electrostática pronunciada, pero en cambio se forma por una combinación de residuos cargados hidrófobos, polares (ver la Figura 17A y Figure 18A). Basado en el análisis de secuencia, se esperaría que una cavidad
5 análoga exista en otros miembros de la familia IL-17; sin embargo, dada la conformación probablemente diferente de la extensión en el N terminal, las características específicas de la cavidad podrían ser bastante diferentes en IL-17B, IL-17C, e IL-17E.

10 NGF enlaza a su receptor de afinidad alto, TrkA, en una posición análoga a la ubicación de las cavidades en IL-17F. La Figura 18B y la Figura 18C mostrada en IL-17F y NGF en la misma orientación resalta las ubicaciones de las cavidades y los sitios que enlazan TrkA (que se esperan sean utilizados
15 por todos los complejos de neurotrofinas/Trk; Weismann et al., Nature 401:184-188 (1999)). Las estructuras conocidas de homodímeros de neurotrofinas (NGF, NT3, NT4) también tienen una identidad en sus superficies en esta posición pero es muy pequeña y más modesto que la cavidad en IL-17F (McDonald et
20 al del et., Nature 354:411-414 (1991)); Butte et al., Biochemistry 37:16846-16852 (1998); Robinson et al Protein Sci. 8:2589-2597 (1999)). Los miembros de la familia Trk son las quinasas de tirosina receptores que interactúan con los neurotrofinas en su dominio como Ig extracelular próximo a la
25 membrana. Mientras no se espere que la estructura de IL-17R o

IL-17RH1 contenga un pliegue como Ig, Las proteínas IL-17 y neurotrofinas podrían emplear regiones similares en sus superficies para enlazar a su receptor.

Las neurotrofinas no sólo enlazan a los receptores de Trk específicos, sino también pueden enlazar a p75_{NTR} simultáneamente, un segundo receptor común a todo los neurotrofinas. El p75_{NTR} enlaza a sus ligandos de neurotrofinas vía un dominio extracelular rico en cistina que se espera se parezca a las estructuras de factor de necrosis del receptor 1 (TNFR1) o receptor 50 de muerte (Banner et al., Cell 73:431-445 (1993); Hymowitz et al., Mol. Cell 4:563-571 (1999); Mongkolsapaya et al., Nat. Struc. Biol. 6:1048-1053 (1999)). Un modelo de interacción de NGF:p75_{NTR} se ha propuesto basado en los datos de mutagénesis (Weismann, C., and de Vos, A. M., Cell. Mol. Life Sci. 58:1-12 (2001)) y sugiere que las vueltas en cualquier extremo del dímero del ligando así como la superficie plana en cada protómero interactúe con p75_{NTR}. Las secuencias de IL-17R e IL-17RH1 no se parece a p75_{NTR} y no se espera adoptar un pliegue como TNFR1. Sin embargo, dada la similitud en IL-17 y los pliegues de las neurotrofinas, es razonable considerar la posibilidad de un segundo componente del receptor para IL-17s, análogo al sistema de las neurotrofinas.

Además, el *späztle* de la proteína también se ha sugerido para adoptar un pliegue de neurotrofinas (Mizuguchi et al.,

TIBS 23:239-242 (1998)) y se ha demostrado genéticamente (aunque no por los experimentos de enlace directo) ser un receptor para el receptor doble de la *drosophila* (Morisato *et al.*, Cell 76:677-688 (1994)). Puesto que IL-17 señala a través de NF- κ B en una trayectoria similar a la usada por los receptores dobles Il-1 que comparten un pliegue común para su dominio intracelular a pesar de que sus dominios extracelulares son muy diferentes, es razonable esperar que ya sea los dominios intracelulares o extracelulares de los receptores IL-17, incluyendo otros componentes aun desconocidos del complejo de señalización, puedan estructuralmente parecerse a las porciones de estos receptores. Sin embargo, con respecto a la estructura del receptor, el modo de interacción entre los ligandos IL-17 y los receptores involucrarán probablemente más cavidades profundas en los lados de la estructura del dímero IL-17.

REIVINDICACIONES

1. Uso de uno o más anticuerpos antagonistas capaces de inhibir tanto IL-17A (SEQ ID NO: 3) e IL-17F (SEQ ID NO: 4), en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno relacionado con lo inmune en un mamífero que necesita del mismo, en donde dicho trastorno relacionado con lo inmune es esclerosis múltiple (MS) o artritis reumatoide (RA).

10 2. El uso de la reivindicación 1 en donde el mamífero es un sujeto humano.

3. El uso de la reivindicación 2 que comprende el uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo antagonista IL-17A, o un fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo antagonista IL-17F o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

4. El uso de la reivindicación 3 en donde dicho anticuerpo antagonista IL-17A se une específicamente a IL-17A (SEQ ID NO: 3) o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

5. El uso de la reivindicación 3 en donde dicho anticuerpo antagonista IL-17F se une específicamente a IL-17F (SEQ ID NO: 4), o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

6. El uso de la reivindicación 3 en donde dicho anticuerpo antagonista IL-17A se une específicamente a IL-17A (SEQ ID NO: 3) o un fragmento de unión a antígeno del mismo y dicho anticuerpo antagonista IL-17F se une específicamente a
5 IL-17F (SEQ ID NO: 4), o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

7. El uso de la reivindicación 2 en donde dicho anticuerpo antagonista se une específicamente a ambos IL-17A
10 (SEQ ID NO: 3) e IL-17F (SEQ ID NO: 4) o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

8. El uso de la reivindicación 7 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo de reactividad cruzada, o un
15 fragmento de unión a antígeno del mismo, que reconoce epítopes idénticos o similares presentes tanto en IL-17A (SEQ ID NO: 3) como en IL-17F (SEQ ID NO: 4).

9. El uso de la reivindicación 7 en donde dicho
20 anticuerpo es un anticuerpo bi-específico, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que tiene especificidad IL-17A y IL-17F.

10. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

5 11. El uso de la reivindicación 10 en donde dicho anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo, es quimérico, humanizado o humano.

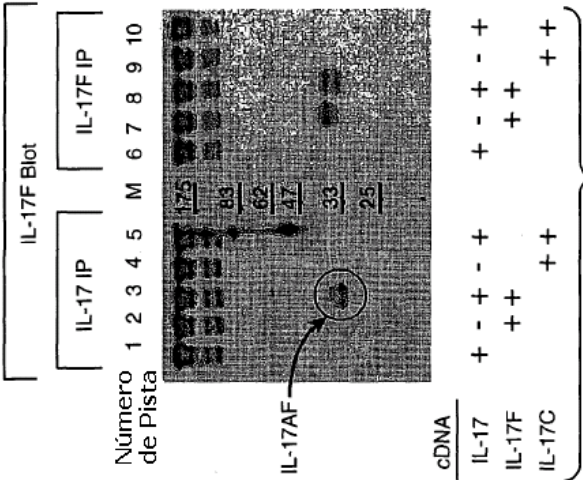
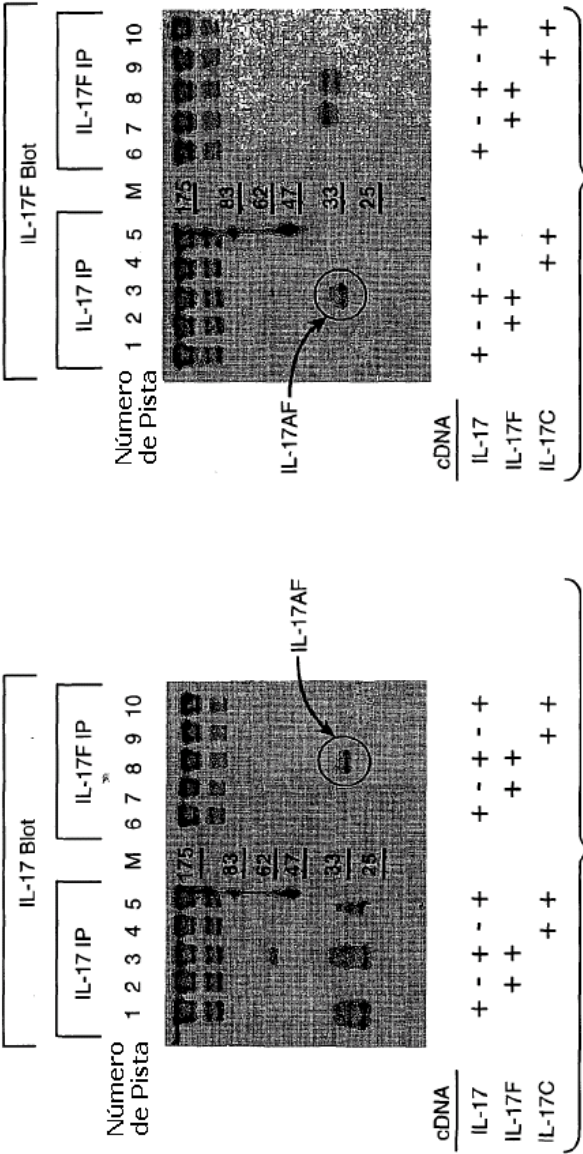
12. El uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de
10 un anticuerpo de reactividad cruzada, en donde dicho anticuerpo reconoce epítopes idénticos o similares presentes tanto en IL-17A, un polipéptido de SEQ ID NO: 3, como en IL-17F un polipéptido de SEQ ID NO: 4, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en la fabricación de un medicamento para
15 tratar un trastorno relacionado con lo inmune en un mamífero que necesita del mismo, en donde dicho trastorno relacionado con lo inmune es esclerosis múltiple (MS) o artritis reumatoide (RA).

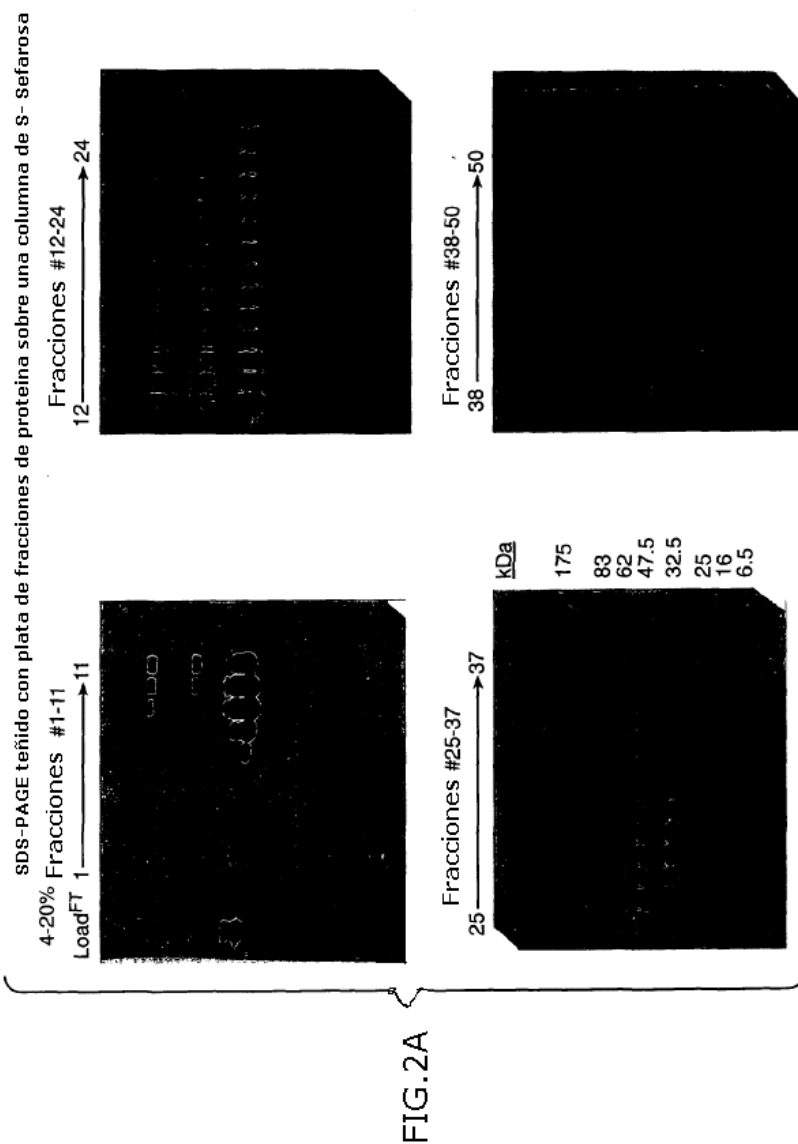
20 13. El uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo bi-específico en donde dicho anticuerpo comprende dos brazos, donde un brazo de dicho anticuerpo reconoce IL-17A, y el otro brazo de dicho anticuerpo reconoce IL-17F, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en la
25 fabricación de un medicamento para tratar un trastorno

relacionado con lo inmune en un mamífero que necesita del mismo, en donde dicho trastorno relacionado con lo inmune es esclerosis múltiple (MS) o artritis reumatoide (RA).

5 14. El uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo bi-específico en donde dicho anticuerpo consiste de una cadena pesada la cual reconoce a IL-17A y una cadena ligera la cual reconoce a IL-17F, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en la fabricación de un
10 medicamento para tratar un trastorno relacionado con lo inmune en un mamífero que necesita del mismo, en donde dicho trastorno relacionado con lo inmune es esclerosis múltiple (MS) o artritis reumatoide (RA).

15 15. El uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo bi-específico, en donde dicho anticuerpo consiste de una cadena pesada la cual reconoce IL-17F y una cadena ligera la cual reconoce IL-17A, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en la fabricación de un
20 medicamento para tratar un trastorno relacionado con lo inmune en un mamífero que necesita del mismo, en donde dicho trastorno relacionado con lo inmune es esclerosis múltiple (MS) o artritis reumatoide (RA).





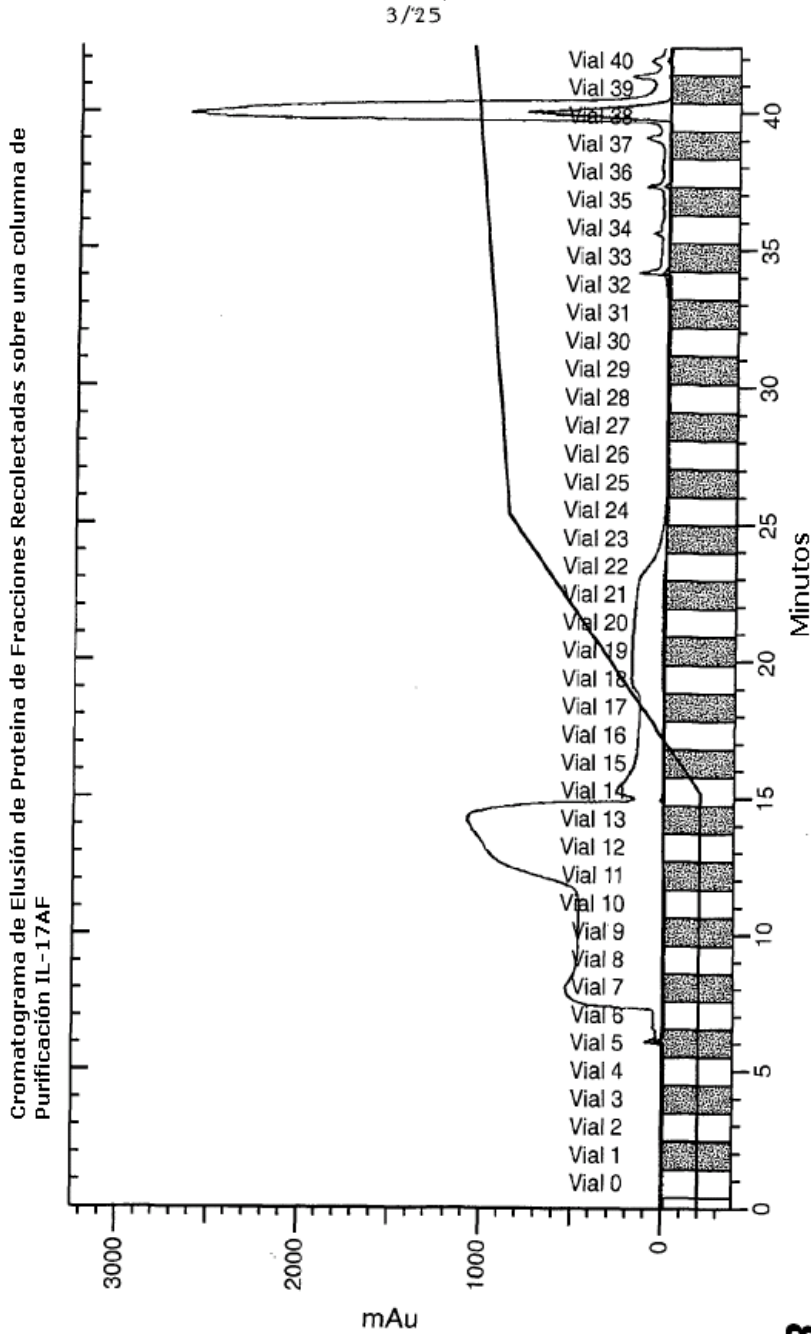
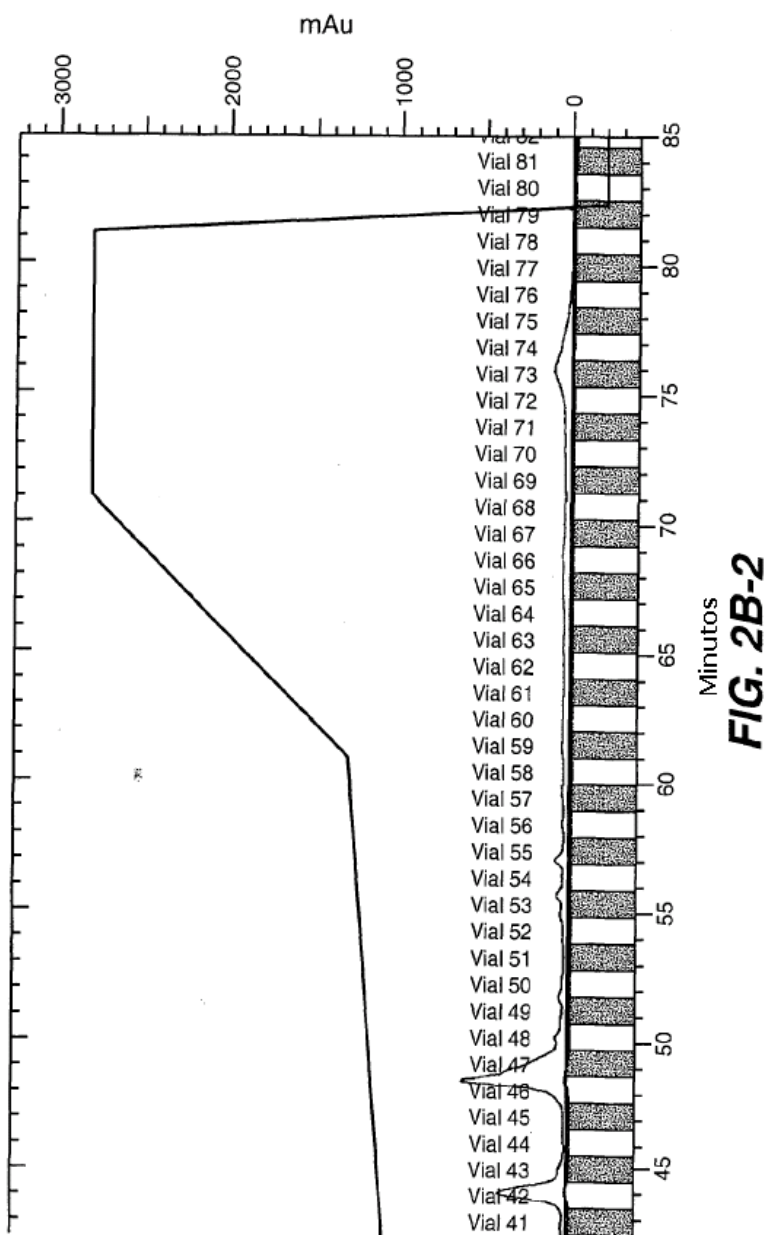


FIG. 2B-1

FIG. 2B

FIG. 2B-1

FIG. 2B-2



HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

Inducción de Actividad de IL-8 por Fracciones sobre una columna de purificación IL-17AF

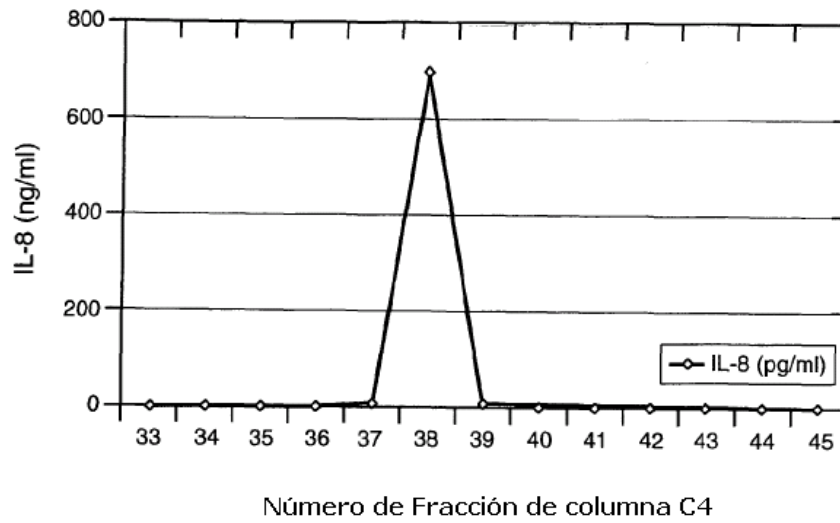


FIG. 2C

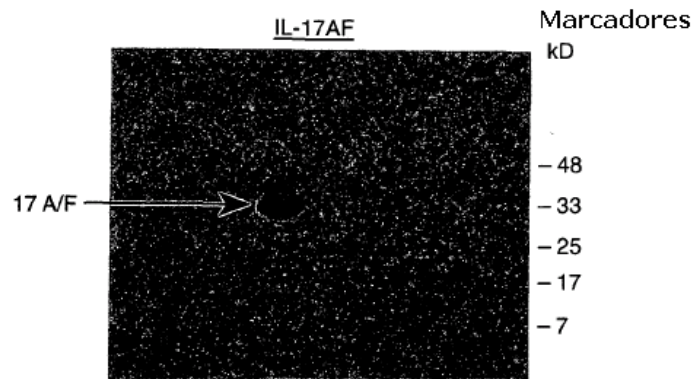


FIG. 3A

SEQ ID NO:	Resultados de Datos de Secuencia													
	Cycle / Run	1 / 3	2 / 4	3 / 5	4 / 6	5 / 7	6 / 8	7 / 9	8 / 10	9 / 11	10 / 12	11 / 13	12 / 14	
SEQ ID NO:1	Sequence 1	G 11.353	I 16.037	T 6.719	I 16.620	P 10.757	R 3.563	N 4.106	P 8.529	G 4.488	C 0.076	P 7.599	N 3.502	
SEQ ID NO:2	Sequence 2	R 16.186	K 3.857	I 25.186	P 6.655	K 2.679	V 7.060	G 2.385	H 3.082	T 2.395	F 3.263	(F) 7.163	Q 4.522	

FIG. 3B

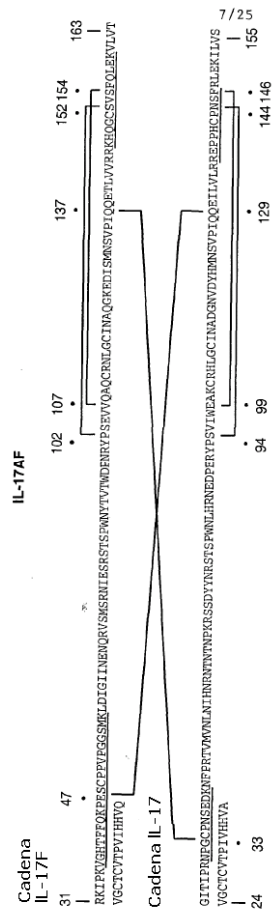
IL-17

MTFGKTSLSVSLLLLSLEAIVKAGITIPRNPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNHNRTNTN
PKRSSDYNNRSTSPWNLHRNEDPERYPSVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEI
LVLRREPHCPNSFRLEKILVSVGCTCTPFIHVHA (SEQ ID NO:3)

IL-17F

MTVKTLLHGPAMVKYLLLSILGLAFLSEAAARKIPKVGHTFFQKPESCPVPVGGSMKL
DIGIINENQRVSMRNIESRSTSPWNYTWTWDENRYPSEVVQAQCRNLGCINAQKEDISM
NSVPIQQETLVVRRKHQGCVSFQLEKVLTVGCTCTPFIHVQ (SEQ ID NO:4)

FIG. 3C



IL-17AF Contiene dos enlaces de bisulfuro intercadena
IL-17F Residuo 47 de cisteina de cadena IL-17 F y residuo 129 de cisteina de cadena IL-17
IL-17F Residuo 137 de cisteina de cadena IL-17F y residuo 33 de cisteina de cadena IL-17

FIG. 4A

IL-17AF Fragmento de enlace a Bisulfuro #1

VGHTFFQKPESCPVPGGSMK (IL-17F Aminoácidos 36-56 del péptido de cadena IL-17F
| digerido con tripsina.
EPPHCPNSFR (IL-17F

Monoisotópico [M+H]⁺ = 3410.58 Da Aminoácidos 30-39 del péptido de cadena de IL-17
digerido con tripsina

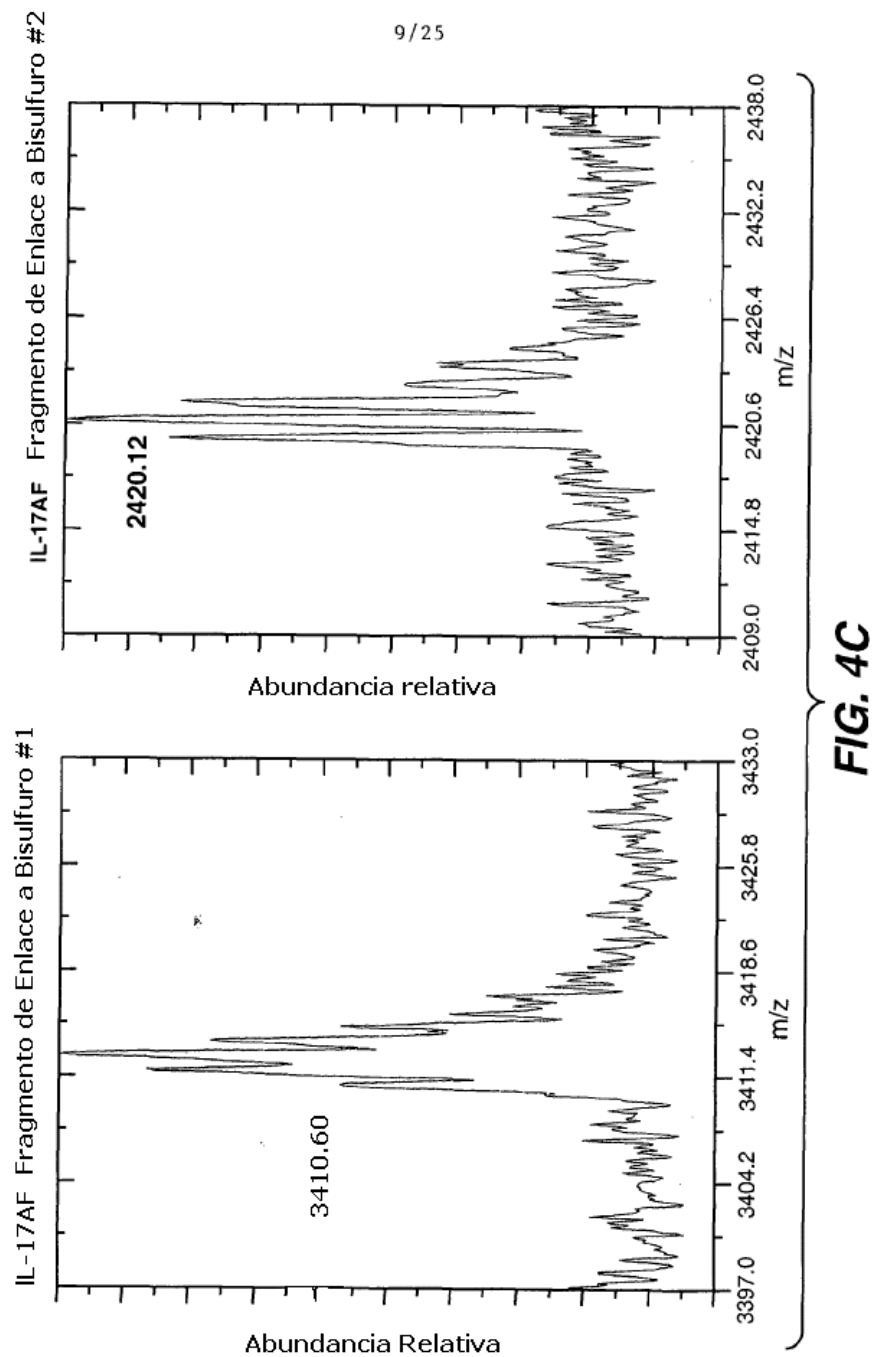
IL-17AF Fragmento de Enlace a Bisulfuro #2

HQGCYSVSFQLEK (IL-17F Aminoácido 134-145 del péptido de cadena de IL-17F digerido
| con tripsina.
NFGCPNSEDK (IL-17 Aminoácidos 30-39 del péptido de cadena de IL-17 digerido con
tripsina

Monoisotópico [M+H]⁺ = 2420.05 Da

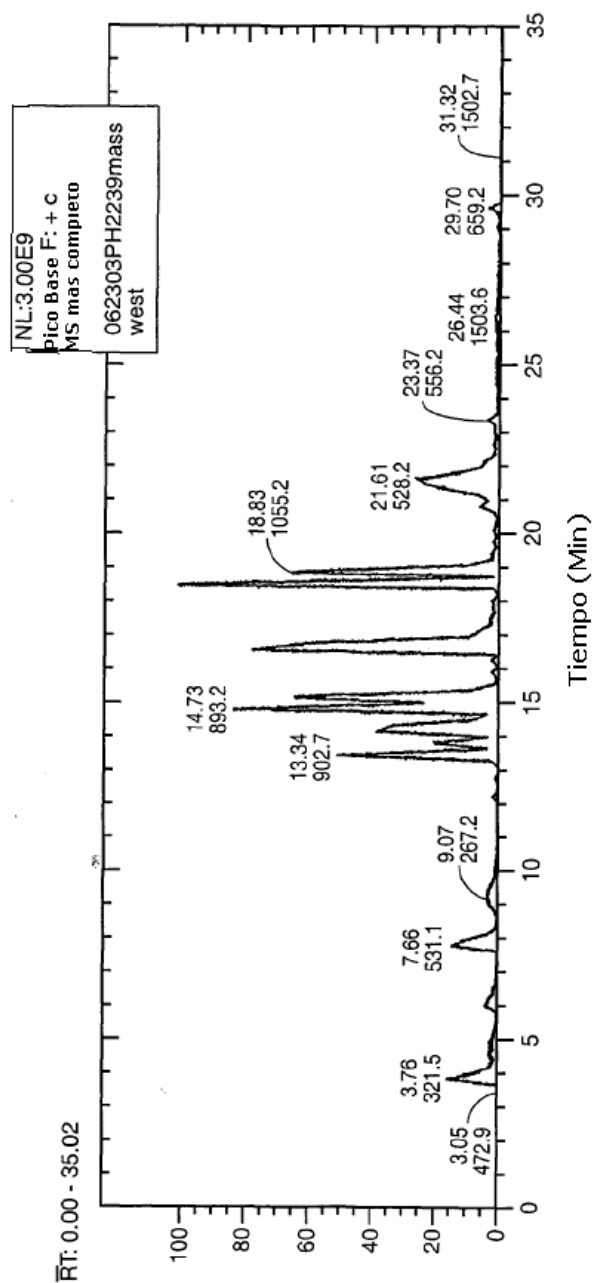
FIG. 4B

9/25



HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

10/25

**FIG. 4D-1**

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

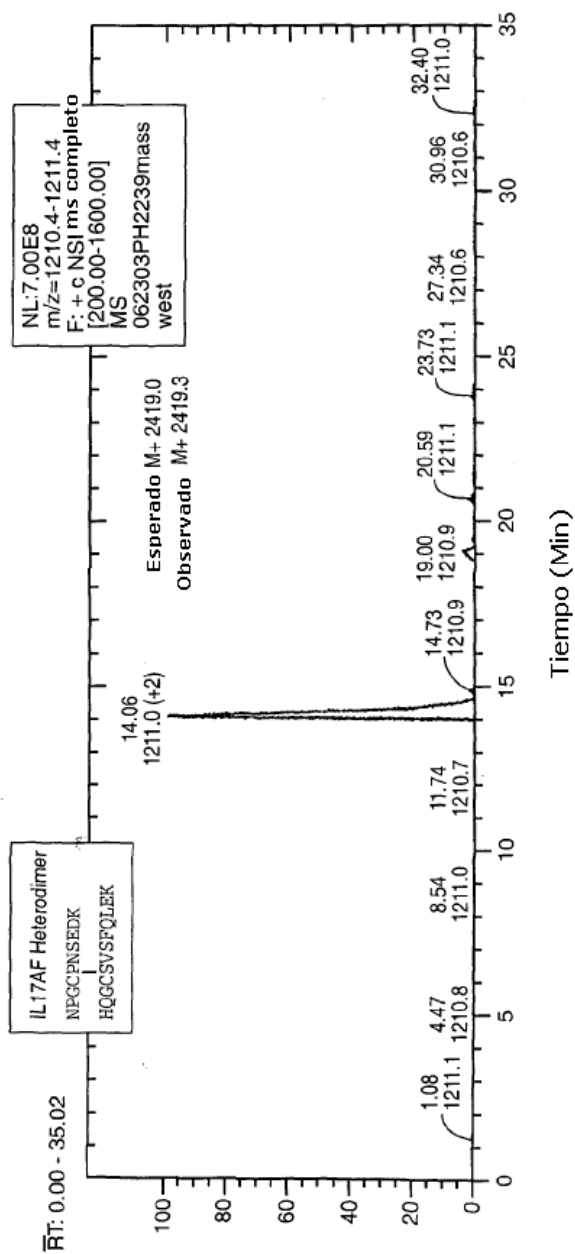
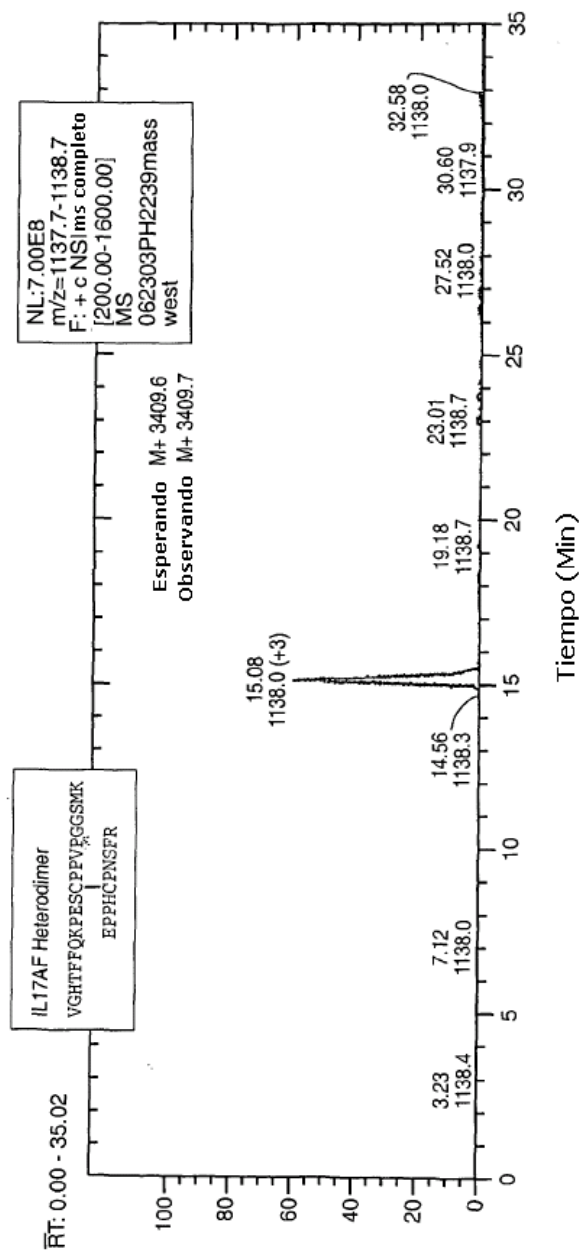


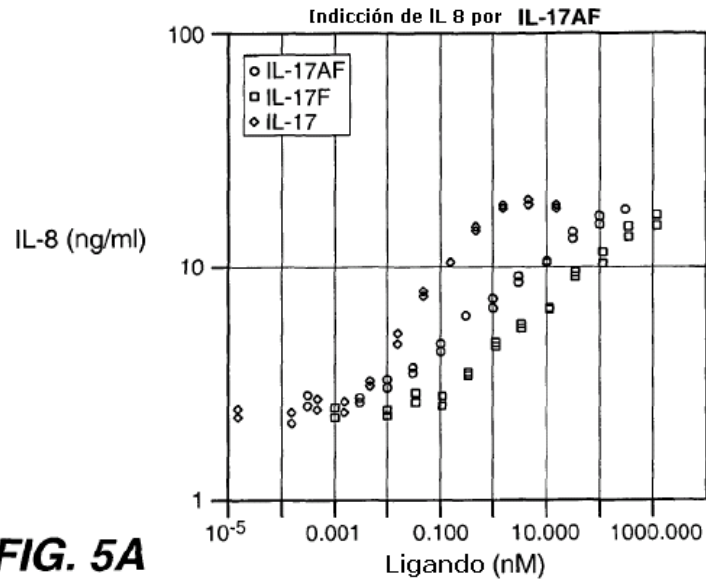
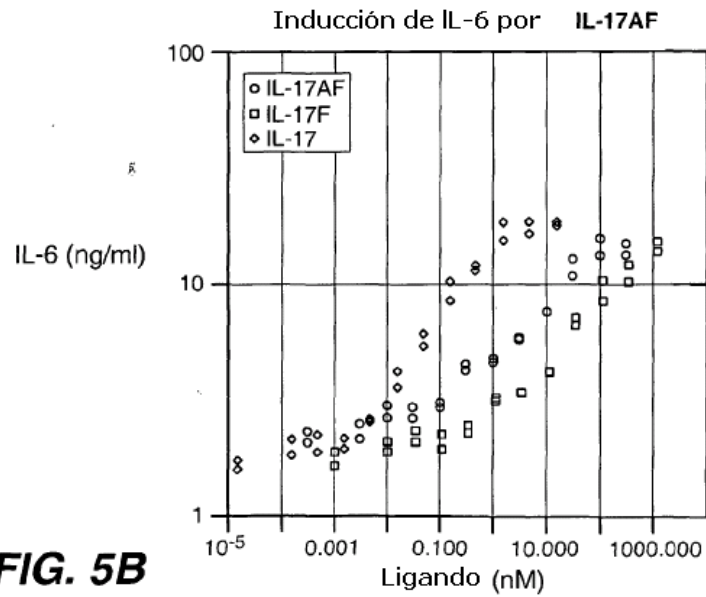
FIG. 4D-2

12/25

**FIG. 4D-3**

13/25

Respuesta a Dosis de Actividad IL-17AF en la inducción de
IL-8:Potencia Observada comparada con IL-17e IL-17F

**FIG. 5A****FIG. 5B**

Secuencia de amino ácidos de región Variable de cadena pesada que contiene CDR
H1-H3 de Fab que enlaza a II-17AF

Clon #	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
1	LSCAASGFTTISDSAIHWRQAPGKGLEWVAGITPYSGYTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCAKEAREGYDVGYAMDYWGQ		
2	LSCAASGFTTISDSYIHWRQAPGKGLEWVAETSPGDDTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARLLWMDGAMDYWGQ		
3	LSCAASGFTTINTWYIHWRQAPGKGLEWVAITPYGATYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARESMWSKFDYWGQ		
4	LSCAASGFTTINSSAIHWRQAPGKGLEWVGYITPDNGTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARHGNFYGTWAAAMDYWGQ		
5	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYEMWYVMDYWGQ		
6	LSCAASGFTTINSWIHWRQAPGKGLEWVGITPSSGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAEGLYQSGIYDAGMDYWGQ		
7	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAEGLYQSGIYDAGMDYWGQ		
8	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAEGLYQSGIYDAGMDYWGQ		
9	LSCAASGFTTISYIHWRQAPGKGLEWVAITPDGATYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARSLDNNLFYDYGQ		
10	LSCAASGFTTINDSDIHWRQAPGKGLEWVGITPYDGYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARSLDNNLFYDYGQ		
11	LSCAASGFTTINGYWIHWRQAPGKGLEWVAITPDNGTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
12	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIITPDNGTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
13	LSCAASGFTTITDSDIHWRQAPGKGLEWVGSITPDNGTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
14	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVGSITPDNGTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
15	LSCAASGFTTITDSDIHWRQAPGKGLEWVGSITPDNGTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
16	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
17	LSCAASGFTTITDSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
18	LSCAASGFTTITDSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
19	LSCAASGFTTITDSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
20	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
21	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
22	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
23	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
24	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
25	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
26	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
27	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
28	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
29	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
30	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
31	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
32	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
33	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		
34	LSCAASGFTTISGSDIHWRQAPGKGLEWVAIINPYGSDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCARAYRCGGGLADWAGAMDYWGQ		

FIG. 6

GCAGGCACAACTCATCCATCCCCAGTTGATTGGAAGAAACAACGATGACTCCTGGGAAG
ACCTCATTGGTGTCACTGCTACTGCTGCTGAGCCTGGAGGCCATAGTGAAGGCAGGAATC
ACAAATCCCACGAAATCCAGGATGCCCAAATTCTGAGGACAAGAACTTCCCCCGGACTGTG
ATGGTCAACCTGAACATCCATAACCGGAATACCAATACCAATCCCAAAGGTCCTCAGAT
TACTACAACCGATCCACCTCACCTTGGAATCTCCACCGCAATGAGGACCCTGAGAGATAT
CCCTCTGTGATCTGGGAGGCAAAGTGCCGCCACTTGGGCTGCATCAACGCTGATGGGAAC
GTGGACTACCATGAACCTCTGTCCCCATCCAGCAAGAGATCCTGGTCTGCGCAGGGAG
CCTCCACACTGCCCCAACTCCTTCCGGCTGGAGAAGATACTGGTGTCCGTGGGCTGCACC
TGTGTCAACCCGATTGTCCACCATGTGGCCTAAGAGCTCTGGGGAGCCCACTCCCCAA
AGCAGTTAGACTATGGAGAGCCGACCCAGCCCCCTAGGAACCCTCATCCTTCAAAGACAG
CCTCATTTCGGACTAAACTCATTAGAGTTCTTAAGGCAGTTTGTCCAATTAAAGCTTCAG
AGGTAACACTTGGCCAAGATATGAGATCTGAATTACCTTTCCCTCTTTCCAAGAAGGAAG
GTTTGACTGAGTACCAATTTGCTTCTTGTTTACTTTTTTAAGGGCTTTAAGTTATTTATG
TATTTAATATGCCCTGAGATAACTTTGGGGTATAAGATTCCATTTTAATGAATTACCTAC
TTTATTTTGTGTTGCTTTTTTAAAGAAGATAAGATTCTGGGCTTGGGAATTTTATTATTTA
AAAGGTAAACCTGTATTTATTTGAGCTATTTAAGGATCTATTTATGTTAAGTATTTAG
AAAAAGGTGAAAAAGCACTATTATCAGTTCTGCCTAGGTAAATGTAAGATAGAATTAAAT
GGCAGTGCAAAATTTCTGAGTCTTTACAACATACGGATATAGTATTTCCCTCCTCTTGTT
TTTAAAAGTTATAACATGGCTGAAAAGAAAGATTAAACCTACTTTCATATGTATTAATTT
AAATTTTGCAATTTGTTGAGGTTTTTACAAGAGATACAGCAAGTCTAACTCTCTGTTCCAT
TAAACCTTATAATAAAATCCTTCTGTAATAATAAAGTTTCAAAGAAAATGTTTATTTG
TTCTCATTAATGTATTTTAGCAAACCTCAGCTCTTCCCTATGGAAGAGTTATGCAAAT
TCTCCTATAAGCAAAACAAAGCATGTCTTTGAGTAACAATGACCTGGAAATACCCAAAAT
TCCAAGTTCTCGATTTCACATGCCTTCAAGACTGAACACCGACTAAGGTTTTCATACTAT
TAGCCAATGCTGTAGACAGAAGCATTTTGATAGGAATAGAGCAAATAAGATAATGGCCCT
GAGGAATGGCATGTCATTATTAAAGATCATATGGGGAAAATGAAACCTCCCCAAAATAC
AAGAAGTTCTGGGAGGAGACATTGTCTTCAGACTACAATGTCCAGTTTCTCCCCTAGACT
CAGGCTTCCTTTGGAGATTAAGGCCCCCTCAGAGATCAACAGACCAACATTTTCTCTTCC
TCAAGCAACACTCCTAGGGCCTGGCTTCTGTCTGATCAAGGCACCACACAACCCAGAAAG
GAGCTGATGGGGCAGAACGAACTTTAAGTATGAGAAAAGTTCAGCCCAAGTAAATAAAA
ACTCAATCACATTCAATTCAGAGTAGTTTCAAGTTTCACATCGTAACCATTTTCGCCC

FIG. 7

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

MTFGKTSLVSLLLLLSLEAIVKAGITIPRNP GCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNP
 KRSSDYNNRSTSPWNLHRNEDPERYP SVIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEIL
 VLRREPPHCPNSFRLEKILVSVGCTCVTPIVHHVA

FIG. 8

CAACTGCACCTCGGTTCTATCGATAGCCACCAGCGCAACAATGACAGTGAAGACCCTGCAT
 GGCCAGCCATGGTCAAGTACTTGCTGCTGTCGATATTGGGGCTTGCCTTTCTGAGTGAG
 GCGGCAGCTCGGAAAATCCCCAAAGTAGGACATACTTTTTCCAAAAGCCTGAGAGTTGC
 CCGCCTGTGCCAGGAGGTAGTATGAAGCTTGACATTGGCATCATCAATGAAAACCAGCGC
 GTTTCATGTACGTAAACATCGAGAGCCGCTCCACCTCCCCCTGGAATTACACTGTCACT
 TGGGACCCCAACCGGTACCCCTCGGAAGTTGTACAGGCCAGTGTAGGAAGTTGGGCTGC
 ATCAATGCTCAAGGAAAGGAAGACATCTCCATGAATTCCGTTCCCATCCAGCAAGAGACC
 CTGGTCGTCGGGAGGAAGCACCAAGGCTGCTCTGTTCTTTCCAGTTGGAGAAGGTGCTG
 GTGACTGTTGGCTGCACCTGCGTCACCCCTGTCATCCACCATGTGCAGTAAGAGGTGCAT
 ATCCACTCAGCTGAAGAAG

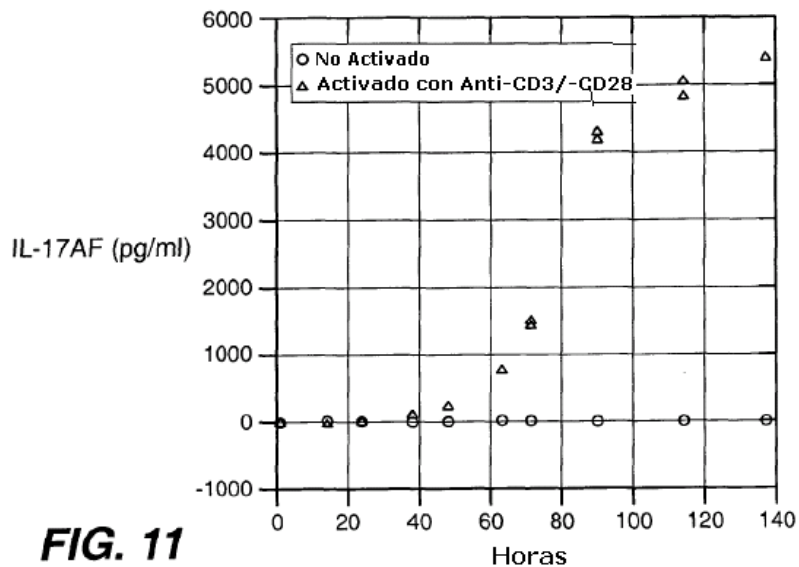
FIG. 9

MTVKTLHGPAMVKYLLLSILGLAFLSEAAARKIPKVGHTFFQKPESCPPVPGGSMKLDIG
 IINENQRVMSRNIESRSTSPWNYTVTWDPNRYPSEVVQAQCRNLGCINAQGKEDISMNS
 VPIQQETLVVRRKHQGC SVSFQLEKVLVTVGCTCVTPVIVHHVQ

Secuencia de señal :	Amino ácidos 1-30
Sitio de N-glicosilación :	Amino ácidos 83-86
Sitios de N- miristoilación	Amino ácidos 106-111;136-141

FIG. 10

Medida de IL-17A/F por ELISA de IL-17A/F producidos a partir de células T humanas activadas con Anti-CD3/Anti-CD28

**FIG. 11**

ELISA de IL-17A/F
Fracciones # 31-33

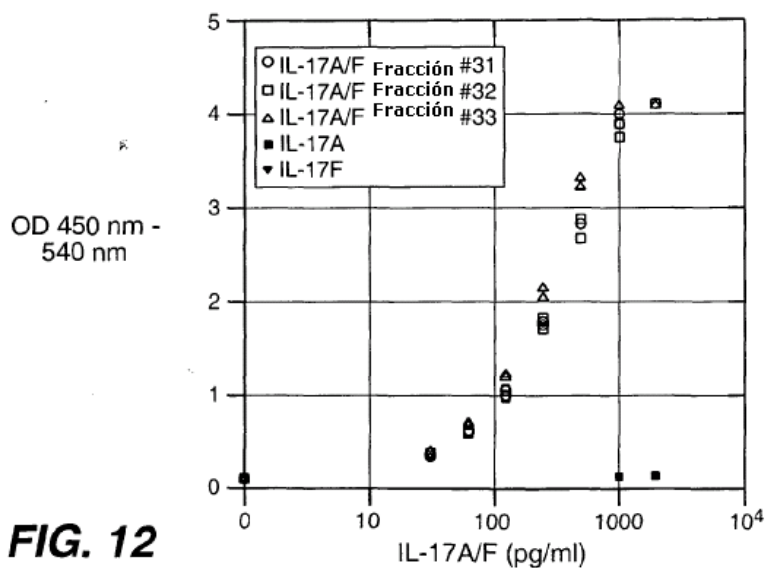
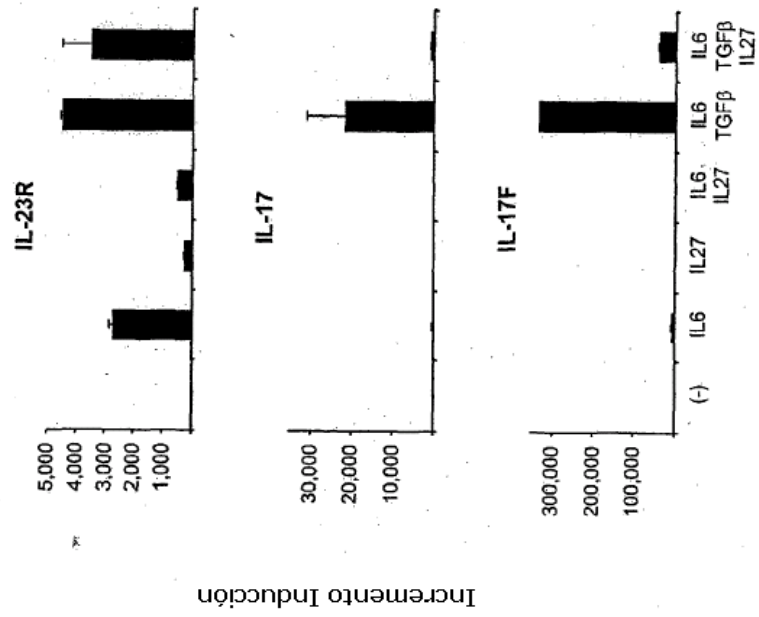
**FIG. 12**

FIGURA 13



Familia IL-17 de Citoquinas tiene patron complejo de Especificidades de Traslape del Receptor-Ligando

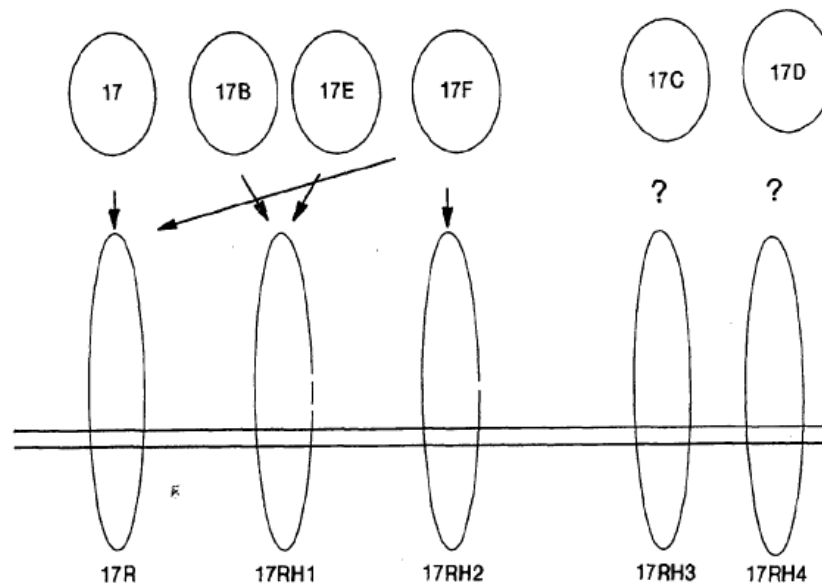


FIGURA 14

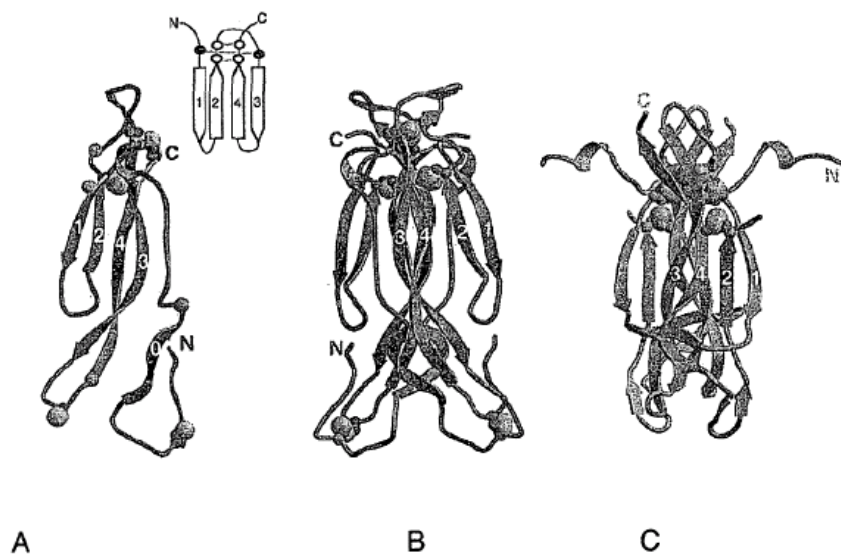
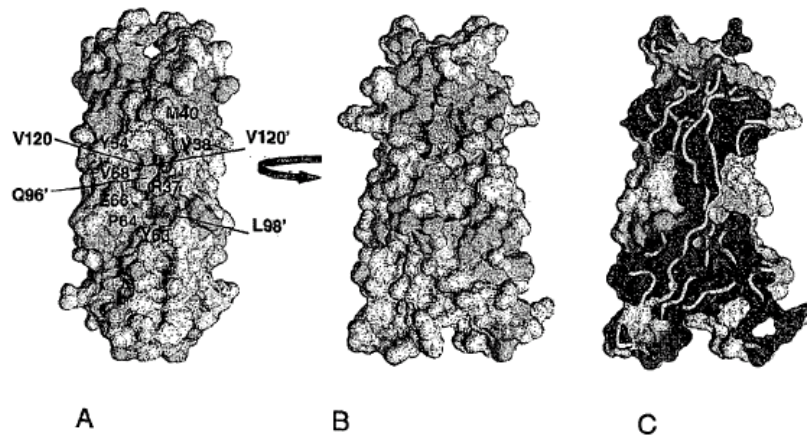


FIGURA 15

						*	
IL-17F				RKIPKVQ	HFFFQKPE\$	17	
IL-17A				IVKAG	ITIFRNP.G	14	
IL-17B	QPRS	PKSKRGQGQR	PGPLAPGSHQ	VPLDLVSRMK	PYARMEEYER	44	
IL-17C	HHDPSLRGHP	HSHGTPHYS	AEEELPLGQAP	PHLLARGAKW	GQALPVALVS	50	
IL-17E			YS	HWPSPSPSKG	QDTSEELLAW	22	
		0			1		
IL-17F	FPVPFGG....	...SMKLDI	GIINENQRVS	MSRNIESRST	PWNVTVTWD	59	
IL-17A	PNSEDKNFPR	TVMVNLIHNIH	RNTNTH..PK	RSSDYNRST	PWNLHRNED	62	
IL-17B	NIEEMVAQLR	.NSSLEAGR	K.EV...NL	QLWMSENKRSL	FWGXSINHd	88	
IL-17C	SLEAAHRGR	..HERPSAQI	C.PVLRFPEV	LEADTHQRSI	PWRVRVDID	98	
IL-17E	STVPVPPLEP	..ARPNRHEE	S.RASE....	.DGPLNSRAI	PWRYELDRD	65	
		2			3		
IL-17F	PNEYPSVEVQ	AQ..RNLG..IN	A...QGKEDIS	MN.VPI.QQE	TLVVRRKHQ\$	106	
IL-17A	PERYP\$VIWE	AK..RHIG..IN	A...DGNVDYH	MN.VPI.QQE	ILVLRREPPH	109	
IL-17B	PSRIQVDLPE	AE.L.LG..VN	PF.TMQEDRS	MN.VPV.FSQ	VEVVRRA...L	133	
IL-17C	EDRYEQKLAF	AE.L.LG..ID	AR.TGREATAA	LV.VRL.LQS	LVLVAR..RP	144	
IL-17E	LNRLEQDLTH	AR.L.LPH..VS	LQTGSNDPR	GN.ELYHNQ	TVFYRRP...I	112	
			4				
* IL-17F	SV.....	...SFQLEK	VL..VTVG.T	VTPVIHHVQ ...	133		
IL-17A	PN.....	...SFRLEK	IL..VSVG.T	VTPVIHKVA ...	136		
IL-17B	PPPPRTGP.	...QRQA	VMETIANG.T	IF.....	160		
IL-17C	SRDGSGLP	PGAFAPHTTF	IH..VFVG.T	V.LPRSVA\$ ALE	184		
IL-17E	HGEKGTHKG	...YLER	RLYRVSLA.V	VPRVPMG...I	145		

FIGURA 16

**FIGURA 17**

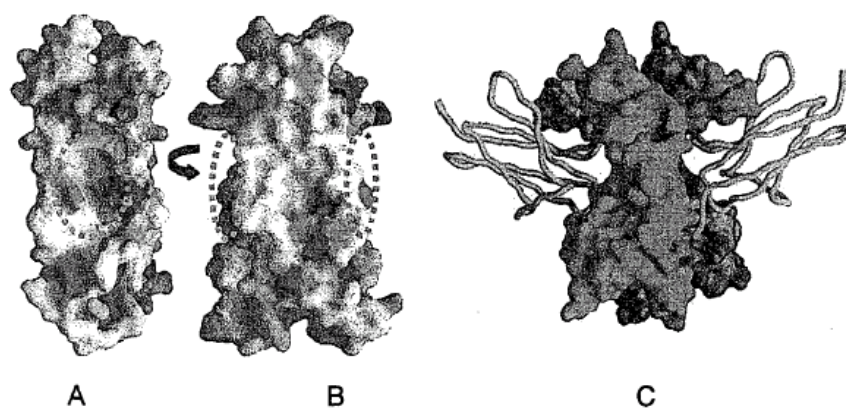


FIGURA 18

Anticuerpos de IL-17A/F en modelo CIA

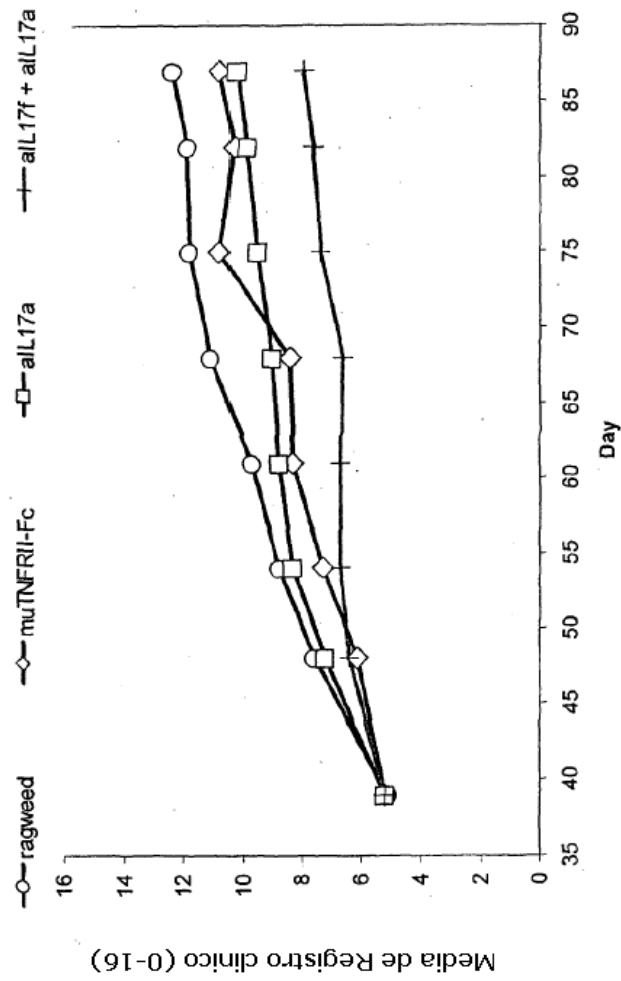


FIGURA 19

Anticuerpos de IL-17A/F en modelo CIA

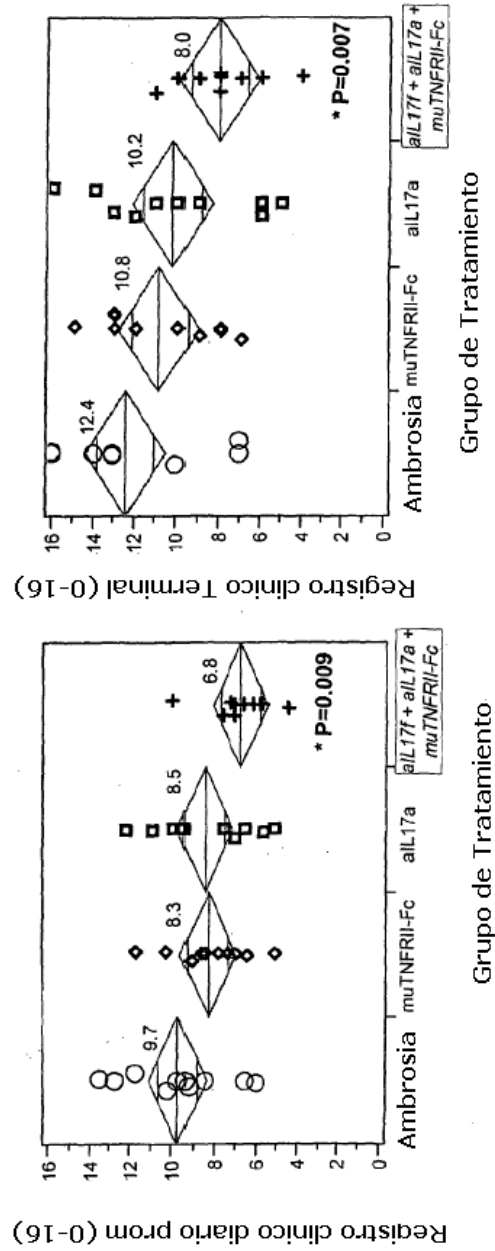


FIGURA 20

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT
Listado de Secuencias

<110> Genentech, Inc.
Arnott, David
Balazs, Mercedes
Ghilardi, Nico
Gurney, Austin
Hass, Phillip
Hymowitz, Sarah
Lee, James
Ouyang, Wenjun
Starovasnik, Melissa
Wu, Yan

<120> POLIPÉPTIDOS HETERODIMÉRICOS IL-17A/F

<130> 39766-0206-1R1P1.PCT

<140> Todavía no asignado

<141> Adjunto

<150> 11/606,192

<151> 2006-11-29

<160> 80

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Inseguro

<222> 10

<223> Aminoácido desconocido

<400> 1

Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Xaa Pro Asn
5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Arg Lys Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln
5 10

<210> 3

<211> 155

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Leu Glu Ala Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn
20 25 30

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

Pro	Gly	Cys	Pro	Asn	Ser	Glu	Asp	Lys	Asn	Phe	Pro	Arg	Thr	Val	35	40	45
Met	Val	Asn	Leu	Asn	Ile	His	Asn	Arg	Asn	Thr	Asn	Thr	Asn	Pro	50	55	60
Lys	Arg	Ser	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Asn	Arg	Ser	Thr	Ser	Pro	Trp	Asn	65	70	75
Leu	His	Arg	Asn	Glu	Asp	Pro	Glu	Arg	Tyr	Pro	Ser	Val	Ile	Trp	80	85	90
Glu	Ala	Lys	Cys	Arg	His	Leu	Gly	Cys	Ile	Asn	Ala	Asp	Gly	Asn	95	100	105
Val	Asp	Tyr	His	Met	Asn	Ser	Val	Pro	Ile	Gln	Gln	Glu	Ile	Leu	110	115	120
Val	Leu	Arg	Arg	Glu	Pro	Pro	His	Cys	Pro	Asn	Ser	Phe	Arg	Leu	125	130	135
Glu	Lys	Ile	Leu	Val	Ser	Val	Gly	Cys	Thr	Cys	Val	Thr	Pro	Ile	140	145	150
Val	His	His	Val	Ala											155		

<210> 4
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT
 Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Val Ile His His Val Gln
 155 160

<210> 5
 <211> 1859
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 gcaggcacaa actcatccat ccccagttga ttggaagaaa caacgatgac 50
 tcctgggaag acctcattgg tgtcactgct actgctgctg agcctggagg 100
 ccatagtga ggcaggaatc acaatccac gaaatccagg atgcccaa 150
 tctgaggaca agaacttccc ccggactgtg atgggtcaacc tgaacatcca 200
 taaccggaat accaatacca atcccaaaaag gtcctcagat tactacaacc 250
 gatccacctc accttgggaat ctccaccgca atgaggaccc tgagagatat 300
 ccctctgtga tctggggaggc aaagtgccgc cacttgggct gcatcaacgc 350
 tgatgggaac gtggactacc acatgaactc tgtcccatc cagcaagaga 400
 tcctggtcct gcgcaggag cctccacact gcccactc cttccggctg 450
 gagaagatac tgggtgccgt gggctgcacc tgtgtcacc cgattgtcca 500
 ccatgtggcc taagagctct ggggagccca cactcccaa agcagttaga 550
 ctatggagag ccgaccagc ccctcaggaa ccctcatcct tcaaagacag 600
 cctcatttcg gactaaactc attagagttc ttaaggcagt ttgtccaatt 650
 aaagcttcag aggtaacact tggccaagat atgagatctg aattaccttt 700
 ccctctttcc aagaaggaag gtttgactga gtaccaattt gcttcttggt 750
 tactttttta agggctttta gttatttatg tatttaatat gccctgagat 800
 aactttgggg tataagattc cattttaatg aattacctac tttattttgt 850
 ttgtcttttt aaagaagata agattctggg cttgggaatt ttattattta 900
 aaaggtaaaa cctgtattta tttgagctat ttaaggatct atttatgttt 950
 aagtatttag aaaaagggtga aaaagcacta ttatcagttc tgcctaggta 1000
 aatgtaagat agaattaaat ggcagtgcaa aatttctgag tctttacaac 1050
 atacggatat agtatttcct cctctttgtt tttaaaagtt ataacatggc 1100
 tgaaaagaaa gattaaacct actttcatat gtattaattt aaattttgca 1150
 atttggtgag gttttacaag agatacagca agtctaactc tctgttccat 1200
 taaaccctta taataaaatc cttctgtaat aataaagttt caaaagaaaa 1250
 tgtttatttg ttctcattaa atgtatttta gcaaaactcag ctcttcccta 1300
 ttgggaagag ttatgcaa at tctcctataa gcaaaacaaa gcatgtcttt 1350

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT
gagtaacaat gacctggaaa tacccaaaat tccaagttct cgatttcaca 1400

tgccttcaag actgaacacc gactaagggtt ttcatactat tagccaatgc 1450

tgtagacaga agcattttga taggaataga gcaaataaga taatggccct 1500

gaggaatggc atgtcattat taaagatcat atggggaaaa tgaaaccctc 1550

cccaaaatac aagaagttct gggaggagac attgtcttca gactacaatg 1600

tccagtttct cccctagact caggcttctt ttggagatta aggccctca 1650

gagatcaaca gaccaacatt tttctcttcc tcaagcaaca ctcctagggc 1700

ctggcttctg tctgatcaag gcaccacaca acccagaaaag gagctgatgg 1750

ggcagaacga actttaagta tgagaaaagt tcagcccaag taaaataaaa 1800

actcaatcac attcaattcc agagtagttt caagtttcac atcgtaacca 1850

ttttcgccc 1859

<210> 6

<211> 559

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

caactgcacc tcggttctat cgatagccac cagcgcaaca tgacagtga 50

gaccctgcat ggcccagcca tgggtcaagta cttgctgctg tcgatattgg 100

ggcttgccct tctgagtga ggcgcagctc ggaaaatccc caaagtagga 150

catacttttt tccaaaagcc tgagagttgc ccgcctgtgc caggaggtag 200

tatgaagctt gacattggca tcatcaatga aaaccagcgc gtttccatgt 250

cacgtaacat cgagagccgc tccacctccc cctggaatta cactgtcact 300

tgggacccca accggtaccc ctcggaagtt gtacaggccc agtgtaggaa 350

cttgggctgc atcaatgctc aaggaaagga agacatctcc atgaattccg 400

ttcccatcca gcaagagacc ctggtcgtcc ggaggaagca ccaaggctgc 450

tctgtttctt tccagttgga gaagggtgctg gtgactgttg gctgcacctg 500

cgtcaccctt gtcatccacc atgtgcagta agaggtgcat atccactcag 550

ctgaagaag 559

<210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu Ser Cys Pro Pro Val
1 5 10 15

Pro Gly Gly Ser Met Lys
20

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

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

<400> 8
 His Gln Gly Cys Ser Val Ser Phe Gln Leu Glu Lys
 5 10

<210> 9
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> polipéptidos sintéticos

<400> 9
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Ser Ala Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 20 25 30
 Gly Ile Thr Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 Tyr Cys Ala Lys Glu Ala Arg Glu Gly Tyr Asp Val Gly Tyr Ala
 80 85 90
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95

<210> 10
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> polipéptidos sintéticos

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

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

Tyr Cys Ala Arg Leu Leu Trp Trp Trp Asp Gly Ala Met Asp Tyr
80 85 90

Trp Gly Gln

<210> 11

<211> 91

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 11

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

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

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

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

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

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

Gln

<210> 12

<211> 96

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 12

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

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

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

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

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

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

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

Met Asp Tyr Trp Gly Gln
95

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

<220>
<223> polipéptidos sintéticos

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

Gly Gln

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

<220>
<223> polipéptidos sintéticos

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

Ala Tyr Cys Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

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

 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos

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

 Tyr Trp Gly Gln

<210> 16
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos

 <400> 16
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Gly Ser Trp Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 20 25 30
 Gly Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Glu Gly Leu Tyr Gln Ser Gly Ile Tyr
 80 85 90

 Asp Ala Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95

<210> 17
 <211> 93

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 17

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

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

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

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

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

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

Trp Gly Gln

<210> 18

<211> 92

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 18

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

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

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

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

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

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

Gly Gln

<210> 19

<211> 98

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 19

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

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

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

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

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

Tyr Cys Ala Arg Ala Tyr Arg Cys Gly Gly Leu Ala Asp Trp Ala
80 85 90

Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
95

<210> 20

<211> 98

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 20

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

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

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

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

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

Tyr Cys Ala Arg Glu Val Phe Ala Val Ser Thr Ala Gly Tyr Pro
80 85 90

Trp Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
95

<210> 21

<211> 96

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 21
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Asp Ser Trp Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 20 25 30
 Ser Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Glu Ser Asp Glu Ala Tyr Ala Ala Val
 80 85 90
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95

<210> 22
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> polipéptidos sintéticos

<400> 22
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Ser Asp Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 20 25 30
 Thr Ile Asn Pro Ala Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Asn Ser Ser Phe Tyr Ala Leu Gln Tyr
 80 85 90
 Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95

<210> 23
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> polipéptidos sintéticos

<400> 23
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Asp Asn Tyr Ile
 1 5 10 15

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

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

<210> 24
<211> 94
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> polipéptidos sintéticos

<400> 24
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Ser Tyr Ile
1 5 10 15
His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
20 25 30
Trp Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
35 40 45
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
50 55 60
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
65 70 75
Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Leu Leu Arg Trp Gly Tyr Ala Met Asp
80 85 90
Tyr Trp Gly Gln

<210> 25
<211> 96
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> polipéptidos sintéticos

<400> 25
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Ser Ala Ile
1 5 10 15
His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
20 25 30

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

Gly Ile Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
35 40 45
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
50 55 60
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
65 70 75
Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Gly Gly Val Phe Val Asp Gly Gly Val
80 85 90
Met Asp Tyr Trp Gly Gln
95

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

<220>
<223> polipéptidos sintéticos

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

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

<220>
<223> polipéptidos sintéticos

<400> 27
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Ser Thr Trp Ile
1 5 10 15
His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
20 25 30
Val Ile Thr Pro Thr Asn Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
35 40 45

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
50 55 60
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
65 70 75
Tyr Cys Ala Arg Glu Val Trp Trp Trp Gly Asp Gly His Gly Tyr
80 85 90
Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
95

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

<220>
<223> polipéptidos sintéticos

<400> 28
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Ser Ala Ile
1 5 10 15
His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
20 25 30
Gly Ile Thr Pro Ala Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
35 40 45
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
50 55 60
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
65 70 75
Tyr Cys Ala Arg Ser Pro Gly Gly Val Phe Val Asp Gly Gly Val
80 85 90
Met Asp Tyr Trp Gly Gln
95

<210> 29
<211> 101
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> polipéptidos sintéticos

<400> 29
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn Ser Thr Asp Ile
1 5 10 15
His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
20 25 30
Arg Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
35 40 45
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
50 55 60

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

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

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

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

<210> 30

<211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 30

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

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

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

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

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

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

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

<210> 31

<211> 90

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 31

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

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

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

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

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

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Phe Phe Asp Asp Tyr Trp Gly Gln
80 85 90

<210> 32

<211> 94

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 32

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

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

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

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

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

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

Tyr Trp Gly Gln

<210> 33

<211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

<210> 34
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos

 <400> 34
 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Thr Gly Thr Tyr Ile
 1 5 10 15
 His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 20 25 30
 Trp Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 35 40 45
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
 50 55 60
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 65 70 75
 Tyr Cys Ala Arg Glu Ala Arg Ser Ser Leu Ser Ala Asp Tyr Ala
 80 85 90
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 95

<210> 35
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> polipéptidos sintéticos

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

<210> 36
 <211> 96

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 36

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

<210> 37

<211> 94

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 37

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

<210> 38

<211> 101

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 38

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

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

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

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

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

Tyr Cys Ala Arg Arg Val Asp Tyr Gln Val Tyr His Asp Arg Phe
80 85 90

Glu Glu Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100

<210> 39

<211> 94

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

<400> 39

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

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

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

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

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

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

Tyr Trp Gly Gln

<210> 40

<211> 94

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> polipéptidos sintéticos

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

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

<210> 41
<211> 94
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> polipéptidos sintéticos

<400> 41
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Asp Ser Gly Ile
1 5 10 15
His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
20 25 30
Phe Ile Tyr Pro Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
35 40 45
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala
50 55 60
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
65 70 75
Tyr Cys Ala Arg Met Ser Leu Ile Gly Phe Ser Tyr Ala Met Asp
80 85 90
Tyr Trp Gly Gln

<210> 42
<211> 93
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> polipéptidos sintéticos

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

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

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

<210> 43
<211> 288
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> nucleótidos sintéticos

<400> 43
ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtgattccg ctatacactg 50
ggcgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttgct gggattactc 100
cttatagcgg ttatactgac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgcaaaagag gcccgcgagg 250
gctacgacgt cggtacgct atggactact ggggtcaa 288

<210> 44
<211> 279
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> nucleótidos sintéticos

<400> 44
ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtgattcct atatacactg 50
ggcgcgtcag gccccgggta agggcctgga atgggttgct gaaatttctc 100
ctcctggcgg cgatacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtctc ttgtggtggt 250
gggacggggc tatggactac tggggtaa 279

<210> 45
<211> 273

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 45

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actaatactt ggatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgct gttattactc 100
cttatggcgg tgctacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgtag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgcaagagag agtatgtgga 250
gtaagttcga ctactgggggt caa 273

<210> 46

<211> 288

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 46

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt aatagttctg ctatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttggt tatattactc 100
ctgataacgg tgatactaac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgtag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aatagctgag gatactgccg tctattattg tgctcgcggc cacggcaact 250
tctacggtag ctgggcgggt atggactact ggggtcaa 288

<210> 47

<211> 276

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 47

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtggttctg atatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgct tatattaatc 100
cttatggcgg ttctactgac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgtag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtgag tacgagatgt 250
ggtagcttat ggactactgg ggtcaa 276

<210> 48

<211> 303

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 48

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actaattcct ggatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttggt gttattactc 100
cttctagcgg ttctacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgtag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtgag gtcttccccg 250
acatcgggga ctgcagcaac gcctactgct acgctatgga ctactgggggt 300
caa 303

<210> 49

<211> 282

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 49

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actagtactt atatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgct tggatttctc 100
cttatagcgg ttatactgac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgtag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtgag gtgggggtggg 250
gggactcgta cgctatggac tactgggggtc aa 282

<210> 50

<211> 297

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 50

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtggttctt ggatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgct gggatttatc 100
cttatgacgg ttatacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgtag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtgag gccgagggcc 250
tgtaccagtc cgggatctac gacgcgggta tggactactg ggggtcaa 297

<210> 51

<211> 279

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 51

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actagttact atatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgct tggatttatc 100
ctgctgacgg tgctacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtggg tcctacttcg 250
ggggctacga tatggactac tggggtaa 279

<210> 52

<211> 276

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 52

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt aatgattctg atatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttggg attatttatc 100
cttatgacgg ttatacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgcaagaagc aacctggaca 250
acaacttggt cgactactgg ggtcaa 276

<210> 53

<211> 294

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 53

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt aatgggttact ggatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgct gatattaatc 100
ctaattggcg ttctactaac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtgcc taccggtgcg 250
gcgggctcgc cgactgggcc ggggctatgg actactgggg tcaa 294

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

<210> 54

<211> 294

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 54

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtggttctt ggatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgct attattactc 100
cttctggcgg taatactgac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtgag gtcttcgccg 250
tgtcgaccgc cggtacccc tgggttatgg actactgggg tcaa 294

<210> 55

<211> 288

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 55

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actgattctt ggatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttggg tctattactc 100
cttataacgg taatactgac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgaggg ggggagtcgg 250
acgaggccta cgccgcgggtt atggactact ggggtcaa 288

<210> 56

<211> 291

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 56

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtagttccg atatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttggg actattaatc 100
ctgctagcgg ttctactgac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgcggc gccaacagca 250
gcttctacgc gctccagtac gttatggact actgggggtca a 291

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

<210> 57

<211> 294

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 57

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actgataatt atatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttggt tggatttctc 100
cttatagcgg ttatacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtgag accctcttct 250
acgacaagga ccagtactcc tacgttatgg actactgggg tcaa 294

<210> 58

<211> 282

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 58

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtagttctt atatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgct tggatttctc 100
cttatagcgg ttatactgac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtgag gggctcctgc 250
ggtaggggcta cgctatggac tactgggggc aa 282

<210> 59

<211> 291

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 59

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actgataatg ggatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttggt tggattactc 100
ctactagcgg ttatactaac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgcgac ggggacacct 250
ggaagtggga cgccccgtac gttatggact actgggggtca a 291

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

<210> 60

<211> 291

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 60

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actaatactt atatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgct tggatttctc 100
cttatagcgg ttatactgac tatgccgata gcgtcaagga ccgtttcact 150
ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgcgag atcttgctgg 250
actacggttc cgcgggctac gctatggact actgggggtca a 291

<210> 61

<211> 291

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 61

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actagtagct ggatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttggt gttattactc 100
ctactaacgg ttctacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgcgag gtgtgggtgg 250
ggggcgacgg ccacggctac gttatggact actgggggtca a 291

<210> 62

<211> 288

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 62

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtagttctg ctatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttggt gggattactc 100
ctgctagcgg ttatacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgctcg cccggcgggg 250
tgttcgtcga cggcgggggtt atggactact ggggtcaa 288

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT

<210> 63

<211> 303

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 63

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt aatagtactg atatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttggt aggattaatc 100
cttctggcgg ttctactaac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtacc agcgcgtaca 250
ccacgtgggc ggtcgactgg ttcacggct acgttatgga ctactggggg 300
caa 303

<210> 64

<211> 303

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 64

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actgggttac ggatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgct tggatttctc 100
cttctaacgg ttatacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtcgc gtcagctact 250
acgtctacag gcacgactgg gtcaggggct acgttatgga ctactggggg 300
caa 303

<210> 65

<211> 267

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 65

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actgatacct ggatacactg 50
ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttggt gttattactc 100
cttatggcgg ttatacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150
ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT
aagagctgag gacactgccg tctattattg tgcaagagac gggggcttct 250

tcgattactg ggggtcaa 267

<210> 66

<211> 282

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 66

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtgattcct ctatacactg 50

gggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgct tttatttatc 100

ctactagcgg ttctacttac tatgccata gcgtcaaggg ccgtttcact 150

ataagcgag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

aagagctgag gacactgccg tctattattg tgcacgtgcc tcgtacgggg 250

tgagcaagtg gacctttgac tactgggggc aa 282

<210> 67

<211> 303

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 67

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actgggttac ggatacactg 50

gggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgct tggatttctc 100

cttctaacgg ttatacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150

ataagcgat acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtcgc gtcagctact 250

acgtctacag gcacgactgg gtcaggggct acgttatgga ctactggggg 300

caa 303

<210> 68

<211> 288

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 68

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actgggtact atatacactg 50

gggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgct tggatttctc 100

cttatagcgg ttatactaac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT
ataagcgag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

aagagctgag gacactgccg tctattattg tgcaagagag gcccgcctcct 250

cgttgagcgc ggactacgct atggactact ggggtcaa 288

<210> 69

<211> 294

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 69

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actgataatt atatacactg 50

ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgct tggatttctc 100

cttatagcgg ttatacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150

ataagcgag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtgag tccggcttct 250

ccgcgtgcaa cacgcgggag tacgctatgg actactgggg tcaa 294

<210> 70

<211> 288

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 70

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actgattctt ggatacactg 50

ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttggt tctattactc 100

cttataacgg taatactgac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150

ataagcgag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgcagg ggggagtcgg 250

acgaggccta cccgcgggtt atggactact ggggtcaa 288

<210> 71

<211> 280

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 71

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actagtaccg ctatacactg 50

ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgct tggattactc 100

cttatgacgg ttatactgac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT
ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctactaa tgaacagctt 200

aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtacg tggttcacgc 250

tggcctcggc tatggaacta ctgggggtcaa 280

<210> 72

<211> 303

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 72

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt actggtaatg ggatacactg 50

ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgct tggatttctc 100

ctactaacgg ttctacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150

ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtagg gtcgactacc 250

aggtctacca cgaccgcttc gaggaggggt acgctatgga ctactgggggt 300

caa 303

<210> 73

<211> 282

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 73

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt aatagttatt ggatacactg 50

ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttggt tggatttctc 100

ctgataacgg tgctactaac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150

ataagcgcag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtagg ttctgggggt 250

gggactgggg gggatatggac tactgggggtc aa 282

<210> 74

<211> 282

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 74

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtgattctt atatacactg 50

ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttggt gatattactc 100

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT
ctactgacgg ttatactgac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150

ataagcgag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgtaac ttgatgtggt 250

gggactcgtc ggctatggac tactggggtc aa 282

<210> 75

<211> 282

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 75

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt agtgattctg ggatacactg 50

ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgg tttatttatc 100

ctaattggcgg ttctacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150

ataagcgag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

aagagctgag gacactgccg tctattattg tgctcgatg tcgttgatcg 250

ggttctcgta cgctatggac tactggggtc aa 282

<210> 76

<211> 279

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> nucleótidos sintéticos

<400> 76

ttgtcctgtg cagcttctgg cttcaccatt aatagtagct ggatacactg 50

ggtgcgtcag gccccgggta agggcctgga atggggttgct tggattaatc 100

cttataacgg ttctacttac tatgccgata gcgtcaaggg ccgtttcact 150

ataagcgag acacatccaa aaacacagcc tacctacaaa tgaacagctt 200

aagagctgag gacactgccg tctattattg tgcaagagac ttgtacgact 250

acgacatcgg cttcgactac tgggggtcaa 279

<210> 77

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Arg Lys Ile Pro Lys Val Gly His Thr Phe Phe Gln Lys Pro Glu
1 5 10 15

Ser Cys Pro Pro Val Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Asp Ile Gly
20 25 30

Ile Ile Asn Glu Asn Gln Arg Val Ser Met Ser Arg Asn Ile Glu

Ser Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Tyr Thr Val Thr Trp Asp Pro
50 55 60
Asn Arg Tyr Pro Ser Glu Val Val Gln Ala Gln Cys Arg Asn Leu
65 70 75
Gly Cys Ile Asn Ala Gln Gly Lys Glu Asp Ile Ser Met Asn Ser
80 85 90
Val Pro Ile Gln Gln Glu Thr Leu Val Val Arg Arg Lys His Gln
95 100 105
Gly Cys Ser Val Ser Phe Gln Leu Glu Lys Val Leu Val Thr Val
110 115 120
Gly Cys Thr Cys Val Thr Pro Val Ile His His Val Gln
125 130

<210> 78
<211> 132
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78
Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp
1 5 10 15
Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn Leu Asn Ile His Asn
20 25 30
Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser Asp Tyr Tyr Asn
35 40 45
Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu Asp Pro Glu
50 55 60
Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His Leu Gly
65 70 75
Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser Val
80 85 90
Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His
95 100 105
Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly
110 115 120
Cys Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
125 130

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79
Glu Pro Pro His Cys Pro Asn Ser Phe Arg
5 10

<210> 80

Listado de Secuencias Genentech, In JLLC 1551 09-033.096 (431361).TXT
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 80
Asn Pro Gly Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys
5 10

TRADUCCION OFICIAL No. 2009-05-14-311
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
Este documento público
2. ha sido firmado por T. Lawrence
3. actuando como Funcionario que Certifica
4. lleva el sello/estampilla de la Oficina de Patentes y Marcas de los EU

Certificado

5. en Washington, D.C.
6. el 29 de abril de 2009
7. por el Funcionario Asistente de Autenticaciones, Departamento de Estado de los Estados Unidos
8. No. 09022611-6
9. Sello/Estampilla
Departamento de Estado
Estados Unidos de América
10. Firma: (ilegible)
Patrick O. Hatchett

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
A TODOS AQUELLOS QUE VIEREN ESTOS PRESENTES:
DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

23 de abril de 2009

POR EL PRESENTE SE CERTIFICA QUE ADJUNTO AL PRESENTE SE
ENCUENTRA UNA COPIA FIEL DE LOS REGISTROS DE ESTA OFICINA DE
UN DOCUMENTO REGISTRADO EL 12 de junio de 2007.

Sello del Departamento de Comercio
Oficina de Patentes y Marcas de los
Estados Unidos

Por Autoridad del
Subsecretario de Comercio para
Propiedad Intelectual y Director de la
Oficina de Patentes y Marcas

(firma: ilegible)

T. LAWRENCE

Funcionario que Certifica

TRASPASO DE PATENTE	
Versión Electrónica v1.1	
Versión Hoja Estilo v1.1	
TIPO DE PRESENTACION	NUEVO TRASPASO
NATURALEZA DEL TRASPASO	TRASPASO
DATOS DE LA PARTE QUE TRASPASA	
Nombre	Fecha de Ejecución
David P. Arnott	02/12/2007
Mercedesz Balazs	02/09/2007
Nico Ghilardi	01/17/2007
Austin L. Gurney	02/10/2007
Philip E. Haas	02/23/2007
Sarah Hymowitz	02/11/2007
James M. Lee	05/28/2007
Wenjun Ouyang	02/09/2007
Melissa A. Starovasnik	02/09/2007
Yan Wu	01/17/2007
DATOS DE LA PARTE QUE RECIBE	
Nombre:	Genentech, Inc.
Dirección:	1 DNA Way
Ciudad:	South San Francisco
Estado/País:	CALIFORNIA
Código Postal:	94080-4990
Total NUMEROS PROPIEDAD: 1	
Tipo de Propiedad	Número
Número de la Solicitud:	11606192

DATOS DE CORRESPONDENCIA	
Número Fax:	(650)952-9881
<i>La correspondencia será enviada vía US Mail cuando el intento por fax no sea exitoso.</i>	
Teléfono:	6502251818
Email:	ptobin@gene.com
Nombre Corresponsal:	Bonny Yeung
Dirección Línea 1:	1 DNA Way
Dirección Línea 2:	MS 49
Dirección Línea 4:	South San Francisco, CALIFORNIA 94080-4990
NUMERO EXPEDIENTE APODERADO	P3237-1R1P1
NOMBRE DEL PRESENTADOR:	Bonny Yeung, Ph.D., J.D.
Total anexos: 12	
fuente=Traspaso#pagina1.tif	
fuente=Traspaso#pagina2.tif	
fuente=Traspaso#pagina3.tif	
fuente=Traspaso#pagina4.tif	
fuente=Traspaso#pagina5.tif	
fuente=Traspaso#pagina6.tif	
fuente=Traspaso#pagina7.tif	
fuente=Traspaso#pagina8.tif	
fuente=Traspaso#pagina9.tif	
fuente=Traspaso#pagina10.tif	
fuente=Traspaso#pagina11.tif	
fuente=Traspaso#pagina12.tif	

PATENTE

REEL: 019416 FRAME: 0817

CARATULA DE FORMATO DE REGISTRO**PATENTES UNICAMENTE**

Comisionado para Patentes: Sírvese registrar los documentos originales adjuntos o copia de los mismos.

1. Nombre de la parte(s) que traspasa: 1. David P. Arnott et al. ¿Se adjunta un nombre(s) adicional de la parte que traspasa? Sí ☐ No ☒	2. Nombre y dirección de la parte(s) que recibe: Nombre: GENENTECH, INC. Dirección Interna: Dirección: 1 DNA Way Ciudad: South San Francisco Estado: California Código Postal: 94080-4990				
3. Naturaleza del traspaso: ☒ Traspaso Fecha de Ejecución: 1/17/07; 2/9/07; 2/10/07; 2/11/07; 2/12/07; 2/23/07; 5/28/07	¿Se adjuntan nombre(s) & dirección adicionales: Sí ☐ No ☒				
4. Número(s) de solicitud o número de patente: Si este documento se presenta junto con una nueva solicitud, la fecha de ejecución de la solicitud es: <table border="0"> <tr> <td data-bbox="245 1398 808 1485">A. Solicitud de Patente No. (s)</td> <td data-bbox="815 1398 1414 1485">B. Patente No. (s)</td> </tr> <tr> <td>11/606.192</td> <td></td> </tr> </table> ¿Se adjuntan números adicionales? Sí ☐ No ☒		A. Solicitud de Patente No. (s)	B. Patente No. (s)	11/606.192	
A. Solicitud de Patente No. (s)	B. Patente No. (s)				
11/606.192					
5. Nombre y dirección de la parte a quien se le debe enviar correspondencia relacionada con este documento: Bonny Yeung, Ph.D., J.D. GENENTECH, INC. 6. Número total de solicitudes y patentes comprendidas: <u>1</u> 7. Total derechos (37 CFR 3.41): \$40.000 ☐ Adjuntos					

1 DNA Way South San Francisco, CA 94080	☒ Autorizado para ser cargado a la cuenta de depósito
8. Número de la cuenta de depósito: <u>07-0630</u>	
NO USE ESTE ESPACIO	
9. Declaración y firma. Según mi mejor saber y entender, la información anterior es fiel y correcta y cualquier copia adjunta es una copia fiel del documento original.	
Bonny Yeung, Ph.D., J.D. Nombre de la Persona que Firma Registro No. 53.811	(firma: ilegible) Firma Fecha 12 de junio de 2007
Número total de páginas incluyendo carátula, anexos y documento: <u>12</u>	
Envíe los documentos que se van a registrar con la información de carátula requerida a: Comisionado para Patentes Mail Stop Assignment Recordation Services P.O. Box 1450 Alexandria, VA 22313-1450	

PATENTE

REEL: 019416 FRAME: 0818

TRASPASO

POR CUANTO, David P. Arnott, un ciudadano de los EU, residente en 356 E. 40th Ave., San Mateo, CA 94403, y Mercedes Balazs, una ciudadana de Hungría, residente en 2735 Driftwood Street, Hayward, CA 94545 y Nico Ghilardi, un ciudadano de los EU, residente en 840 Brookside Lane, Millbrae, CA 94030 y Austin L. Gurney, un ciudadano de los EU, residente en 946 Diamond Street, San Francisco, CA 94114, y Philip E. Haas, un ciudadano de los EU, residente en 558 Sierra St., Moss Beach, CA 94038, y Sarah Hymowitz, una ciudadana de los EU, residente en 1050 Francisco Street, San Francisco, CA 94109 y James M. Lee, un ciudadano de los EU, residente en 705 Shelter Creek Lane, San Bruno, CA 94066, y Melissa M. Starovasnik, una ciudadana de los EU, residente en 190 Dorantes Avenue, San Francisco, CA 94116 y Wenjun Ouyang, un ciudadano de China, residente en 1057 Galley Lane, Foster City, CA 94404 y Yan Wu, un ciudadano de los EU, residente en 846 Andromeda Lane, Foster City, CA 94404 (en adelante "CEDENTES"), hemos inventado una invención nueva y útil en

Polipéptidos Heterólogos IL-17A/F y Usos Terapéuticos de los mismos

para la cual una solicitud Serie No. 11/606.192 (Expediente No. P3237-1R1P1) para Patente de Invención ha sido radicada por ellos el 29 de noviembre de 2006; y

POR CUANTO, GENENTECH, INC. una sociedad constituida y existente bajo y en virtud de las leyes del Estado de Delaware, que tiene un lugar de negocios en 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, desea

adquirir un interés en y de dicha invención, y en y de Patente de Invención que se obtendrá por lo tanto;

AHORA, POR LO TANTO, sépase por todos a quienes corresponda;

Que por una contraprestación buena y valiosa el recibo de lo cual se reconoce por el presente, dichos CEDENTES han y por el presente venden, ceden, transfieren y traspasas a dicho GENENTECH, INC. sus sucesores y cesionarios, todo el derecho, título e interés incluyendo todos los derechos bajo la Convención de París para la Protección de Propiedad Industrial, en y de dicha invención, y en y de cualquiera y todas las Patentes de Invención que se otorguen y expidan por lo tanto o cualquier continuación, división, renovación o sustituto de ello, y en cuanto a Patente de Invención cualquier reexpedición o reexamen de ello, no únicamente para, de y en los Estados Unidos de América, sus territorios y posesiones, pero para, de y en todos los otros países; y ha sido y por el presente se autoriza y solicita que las agencias gubernamentales apropiadas expidan dicha Patente de Invención a GENENTECH, INC., de conformidad con este Traspaso.

Dichos CEDENTES acuerdan y consienten cooperar con GENENTECH, INC., para permitirle a dicho GENENTECH, INC. disfrutar todo el alcance el derecho, título e interés por el presente traspasado en los Estados Unidos y países extranjeros. Dicha cooperación por dichos CEDENTES incluye la producción oportuna de hechos y documentos pertinentes, dar testimonio, ejecución de memoriales, juramentos, especificaciones, declaraciones u otros documentos, y otra asistencia todo del alcance considerado o deseable por dicho GENENTECH, INC., (a) para perfeccionar el derecho, título e interés por el presente traspasado; (b) para procesar cualquiera de dichas solicitudes; (c) para radicar y procesar solicitudes para reexpedición de cualquiera de dichas patentes; (d) para interferencia o otros procedimientos de prioridad que comprendan a dicha invención; y (e) para procedimientos legales que

comprendan a dicha invención y cualquier solicitud por lo tanto y cualquier patente otorgada sobre ello, incluyendo sin limitación procedimientos de oposición, procedimientos de cancelación, impugnaciones de prioridad, procedimientos de uso público, acciones de infracción y acciones de tribunal; siempre y cuando, sin embargo, que el gasto incurrido por dicho CEDENTE para proporcionar dicha cooperación sea pagado por dicho GENETECH, INC.

Los términos y acuerdos de este traspaso entrarán en vigencia para el beneficio de dicho GENENTECH, INC., sus sucesores, cesionarios y otros representantes legales, y será obligatorio para dicho CEDENTE, sus respectivos herederos, representantes legales y cesionarios.

Dichos CEDENTES por el presente garantizan y afirman que no han celebrado y no celebrarán ningún traspaso, contrato o entendimiento en conflicto con el presente.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, firmamos como sigue:

South San Francisco	(firma: ilegible)
Fechado: 12 de febrero de 2007	David P. Arnott
South San Francisco	(firma: ilegible)
Fechado: 2/9/07	Mercedesz Balazs
South San Francisco	(firma: ilegible)
Fechado: 1/17/07	Nico Ghilardi
South San Francisco	(firma: ilegible)
Fechado: 02/10/07	Austin L. Gurney
South San Francisco	(firma: ilegible)

Fechado: 2/23/07

Philip E. Haas

South San Francisco

(firma: ilegible)

Fechado: 2/11/07

Sarah Hymowitz

South San Francisco

(firma: ilegible)

Fechado: 28 de mayo de 2007

James M. Lee

South San Francisco

(firma: ilegible)

Fechado: 2/9/2007

Wenjun Ouyang

South San Francisco

(firma: ilegible)

Fechado: 2/9/07

Melissa A. Starovasnik

South San Francisco

(firma: ilegible)

Fechado: 1/17/2007

Yan Wu¹

REGISTRADO: 06/12/2007

PATENTE

REEL: 019416 FRAME: 0829

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 14 de mayo de 2009, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

¹ Nota del Traductor: Se repite el documento de traspaso con las firmas de cada traductor en hojas aparte.

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by T. Lawrence

3. acting in the capacity of Certifying Officer

4. bears the seal/stamp of U.S. Patent and Trademark Office

Certified

5. at Washington, D.C.

6. the twenty-ninth of April, 2009

7. by Assistant Authentication Officer, United States Department of State

8. No. 09022611-6

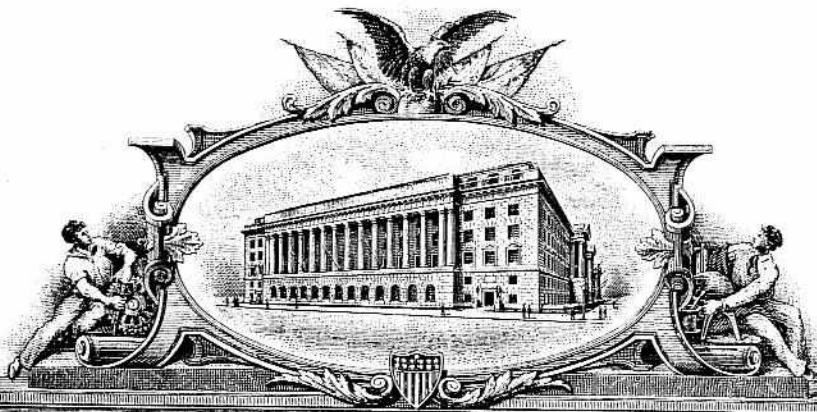
9. Seal/Stamp:

10. Signature:


Patrick O. Hatchett



A 7160560



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

April 23, 2009

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED IS A TRUE COPY FROM THE
RECORDS OF THIS OFFICE OF A DOCUMENT RECORDED ON
JUNE 12, 2007.

By Authority of the

Under Secretary of Commerce for Intellectual Property
and Director of the United States Patent and Trademark Office

T. LAWRENCE

Certifying Officer



PATENT ASSIGNMENT

Version v1.1
Version v1.1

ION TYPE:	NEW ASSIGNMENT
OF CONVEYANCE:	ASSIGNMENT

YING PARTY DATA

Name	Execution Date
P. Arnott	02/12/2007
edesz Balazs	02/09/2007
Ghilardi	01/17/2007
n L. Gurney	02/10/2007
p E. Hass	02/23/2007
ah Hymowitz	02/11/2007
nes M. Lee	05/28/2007
enjun Ouyang	02/09/2007
elissa A. Starovasnik	02/09/2007
an Wu	01/17/2007

RECEIVING PARTY DATA

Name:	Genentech, Inc.
Street Address:	1 DNA Way
City:	South San Francisco
State/Country:	CALIFORNIA
Postal Code:	94080-4990

PROPERTY NUMBERS Total: 1

Property Type	Number
Application Number:	11606192

CORRESPONDENCE DATA

Fax Number: (650)952-9881
Correspondence will be sent via US Mail when the fax attempt is unsuccessful.
 Phone: 6502251818
 Email: ptobin@gene.com
 Correspondent Name: Bonny Yeung
 Address Line 1: 1 DNA Way

500294565

PATENT
REEL: 019416 FRAME: 0816

CH \$40.00 11606192

2: MS 49
4: South San Francisco, CALIFORNIA 94080-4990

DOCKET NUMBER:	P3237-1R1P1
SUBMITTER:	Bonny Yeung, Ph.D., J.D.

ments: 12
ignment#page1.tif
ignment#page2.tif
ignment#page3.tif
ignment#page4.tif
ignment#page5.tif
ssignment#page6.tif
ssignment#page7.tif
ssignment#page8.tif
ssignment#page9.tif
Assignment#page10.tif
Assignment#page11.tif
Assignment#page12.tif

PATENT
REEL: 019416 FRAME: 0817

RECORDATION FORM COVER SHEET
PATENTS ONLY

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Patent and Trademark Office

Atty Dkt No: P3237-IR1P1

Commissioner for Patents: Please record the attached original documents or copy thereof.

1. Name of conveying party(ies):

David P. Arnott et al.

Additional name(s) of conveying party(ies) attached? Yes ___ No X

2. Name and address of receiving party(ies):

Name: GENENTECH, INC.

Internal Address:

Street Address: 1 DNA Way

City: South San Francisco State: California

ZIP: 94080-4990

Additional name(s) & address(es) attached? Yes ___ No X

Nature of conveyance:

☒ Assignment

Execution Date:

7/07;2/9/07;2/10/07;2/11/07;2/12/07;2/23/07;5/28/07

Application number(s) or patent number(s):

If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is:

A. Patent Application No.(s)

11/606,192

B. Patent No.(s)

Additional numbers attached? Yes ___ No X

5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed:

Bonny Yeung, Ph.D., J.D.
GENENTECH, INC.
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080

6. Total number of applications and patents involved: 1

7. Total fee (37 CFR 3.41): \$ 40.00

☐ Enclosed

☒ Authorized to be charged to deposit account

8. Deposit account number:

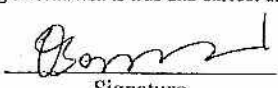
07-0630

DO NOT USE THIS SPACE

9. Statement and signature.

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document.

Bonny Yeung, Ph.D., J.D.
Name of Person Signing
Registration No. 53,811


Signature

June 12, 2007
Date

Total number of pages comprising cover sheet, attachments and document: 12

Mail documents to be recorded with required cover sheet information to:

Commissioner of Patents
Mail Stop Assignment Recordation Services
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Revised (10/11/95)

PATENT

REEL: 019416 FRAME: 0818

ASSIGNMENT

WHEREAS, David P. Arnott, a citizen of U.S.A., residing at 356 E. 40th Ave., San Mateo, CA 94403, and Mercedesz Balazs, a citizen of Hungary, residing at 2735 Driftwood Street, Hayward, CA 94545 and Nico Ghilardi, a citizen of U.S.A., residing at 840 Brookside Lane, Millbrae, CA 94030 and Justin L. Gurney, a citizen of U.S.A., residing at 946 Diamond Street, San Francisco, CA 94114, and Philip E. Hass, a citizen of U.S.A., residing at 558 Sierra St., Moss Beach, CA 94038, and Sarah Lymowitz, a citizen of U.S.A., residing at 1050 Francisco Street, San Francisco, CA 94109 and James M. Lee, a citizen of U.S.A., residing at 705 Shelter Creek Lane, San Bruno, CA 94066, and Melissa M. Starovasnik, a citizen of U.S.A., residing at 190 Dorantes Avenue, San Francisco, CA 94116 and Wenjun Ouyang, a citizen of China, residing at 1057 Galley Lane, Foster City, CA 94404 and Yan Wu, a citizen of U.S.A., residing at 846 Andromeda Lane, Foster City, CA 94404 (hereinafter "ASSIGNORS"), have invented a new and useful invention in

IL-17A/F Heterologous Polypeptides and Therapeutic Uses Thereof

for which an application Serial No. 11/606,192 (Docket No. P3237-1R1P1) for Letters Patent has been filed by them on November 29, 2006; and

WHEREAS, GENENTECH, INC., a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the State of Delaware, having a place of business at 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, is desirous of acquiring an interest in and to said invention, and in and to the Letters Patents to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, be it known by all whom it may concern;

That for good and valuable consideration the receipt of which is hereby acknowledged, the said ASSIGNORS have and do hereby sell, assign, transfer and set over unto the said GENENTECH, INC., its successors and assigns, the full and exclusive right, title and interest including all rights under the Paris Convention for the Protection of Industrial Property, in and to said invention, and in and to any and all Letters Patents to be granted and issued therefor or any continuation, division, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patents any reissue or re-examination thereof, not only for, to, and in the United States of America, its territories and possessions, but for, to and in all other countries; and it has been and is hereby authorized and requested that the appropriate government agencies issue said Letters Patents to said GENENTECH, INC., in accordance with this Assignment.

Said ASSIGNORS covenant and agree to cooperate with GENENTECH, INC., to enable said GENENTECH, INC. to enjoy to the fullest extent the right, title and interest herein conveyed in the United States and foreign countries. Such cooperation by said ASSIGNORS includes prompt production of pertinent facts and documents, giving of testimony, execution of petitions, oaths, specifications, declarations or other papers, and other assistance all to the extent deemed necessary or desirable by said GENENTECH, INC., (a) for perfecting the right, title and interest herein conveyed; (b) for prosecuting any of said applications; (c) for filing and prosecuting applications for reissuance of any of said patents; (d) for interference or other priority proceedings involving said invention; and (e) for legal proceedings involving said invention and any applications therefor and any patents granted thereon, including without limitation opposition proceedings, cancellation proceedings, priority contests, public

use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

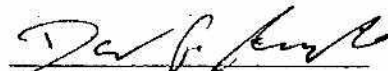
The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: Feb. 12, 2007


David P. Arnott

South San Francisco

Dated: _____

Mercedesz Balazs

South San Francisco

Dated: _____

Nico Ghilardi

South San Francisco

Dated: _____

Austin L. Gurney

South San Francisco

Dated: _____

Philip E. Hass

South San Francisco

Dated: _____

Sarah Hymowitz

South San Francisco

Dated: _____

James M. Lee

use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

David P. Arnott

Dated: _____

South San Francisco

Mercedesz Balazs

Dated: 2/9/07

South San Francisco

Nico Ghilardi

Dated: _____

South San Francisco

Austin L. Gurney

Dated: _____

South San Francisco

Philip E. Hass

Dated: _____

South San Francisco

Sarah Hymowitz

Dated: _____

South San Francisco

James M. Lee

Dated: _____

use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

David P. Arnott

Dated: _____

South San Francisco

Mercedesz Balazs

Dated: _____

South San Francisco

N. Ghilardi
Nico Ghilardi

Dated: 11/17/07

South San Francisco

Austin L. Gurney

Dated: _____

South San Francisco

Philip E. Hass

Dated: _____

South San Francisco

Sarah Hymowitz

Dated: _____

South San Francisco

James M. Lee

Dated: _____

use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

David P. Arnott

Dated: _____

South San Francisco

Mercedesz Balazs

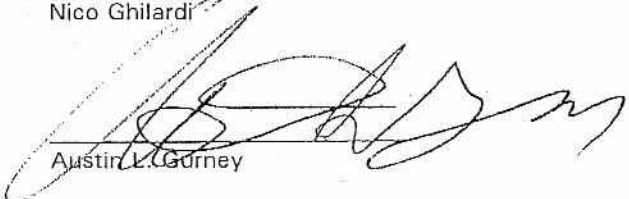
Dated: _____

South San Francisco

Nico Ghilardi

Dated: _____

South San Francisco



Austin L. Gurney

Dated: 7/16/07

South San Francisco

Philip E. Hass

Dated: _____

South San Francisco

Sarah Hymowitz

Dated: _____

South San Francisco

James M. Lee

Dated: _____

use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

David P. Arnott

Dated: _____

South San Francisco

Mercedesz Balazs

Dated: _____

South San Francisco

Nico Ghilardi

Dated: _____

South San Francisco

Austin L. Gurney

Dated: _____

South San Francisco

Philip E. Hass
Philip E. Hass

Dated: 2/23/07

South San Francisco

Sarah Hymowitz

Dated: _____

South San Francisco

James M. Lee

Dated: _____

use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

David P. Arnott

South San Francisco

Dated: _____

Mercedesz Balazs

South San Francisco

Dated: _____

Nico Ghilardi

South San Francisco

Dated: _____

Austin L. Gurney

South San Francisco

Dated: _____

Philip E. Hass

South San Francisco

Dated: 2/11/07

Sarah Hymowitz
Sarah Hymowitz

South San Francisco

Dated: _____

James M. Lee

use proceedings, infringement actions and court actions; provided, however, that the expense incurred by said ASSIGNORS in providing such cooperation shall be paid for by said GENENTECH, INC.

The terms and covenants of this assignment shall inure to the benefit of said GENENTECH, INC., its successors, assigns and other legal representatives, and shall be binding upon said ASSIGNORS, their respective heirs, legal representatives and assigns.

Said ASSIGNORS hereby warrant and represent that they have not entered and will not enter into any assignment, contract, or understanding in conflict herewith.

IN WITNESS WHEREOF we undersign as follows;

South San Francisco

Dated: _____

David P. Arnott

South San Francisco

Dated: _____

Mercedesz Balazs

South San Francisco

Dated: _____

Nico Ghilardi

South San Francisco

Dated: _____

Austin L. Gurney

South San Francisco

Dated: _____

Philip E. Hass

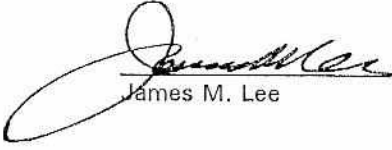
South San Francisco

Dated: _____

Sarah Hymowitz

South San Francisco

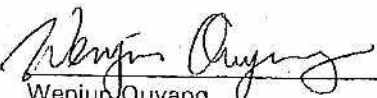
Dated: 2007
May 28



James M. Lee

South San Francisco

Dated: 2/9/2007


Wenjun Ouyang

South San Francisco

Dated: _____

Melissa A. Starovasnik

South San Francisco

Dated: _____

Yan Wu

South San Francisco

Dated: _____

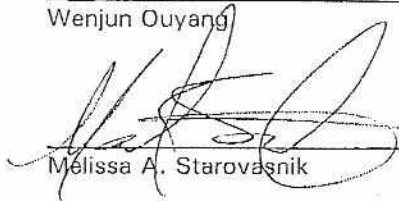
South San Francisco

Dated: 2/9/07

South San Francisco

Dated: _____

Wenjun Ouyang



Melissa A. Starovasnik

Yan Wu

South San Francisco

Dated: _____

Wenjun Ouyang

South San Francisco

Dated: _____

Melissa A. Starovasnik

South San Francisco

Dated: 1/17/2007

Yan Wu
Yan Wu

Received

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2007/085269

LMI PD
GNE-0206 WOP

MAY 20 2009

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

Goodwin Procter LLP
Silicon Valley OfficeNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

DREGER, Ginger, R.
Goodwin Procter LLP
135 Commonwealth Drive
Menlo Park, CA 94025
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 05 May 2009 (05.05.2009)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference GNE-0206-1R1P1.PC	
International application No. PCT/US2007/085269	International filing date (day/month/year) 20 November 2007 (20.11.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address BALAZS, Mercedes 2735 Driftwood Street Hayward, CA 94545 United States of America	State of Nationality HU	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address BALAZS, Mercedesz 2735 Driftwood Street Hayward, CA 94545 United States of America	State of Nationality HU	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Perez Roberto

DO NOT WRITE
MAY 22 2009

Facsimile No. +41 22 338 71 30

e-mail pt09.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 09

Received

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2007/085269

MAY 20 2009

From the INTERNATIONAL BUREAU

Goodwin Procter LLP
Silicon Valley Office**PCT**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

DREGER, Ginger, R.
Goodwin Procter LLP
135 Commonwealth Drive
Menlo Park, CA 94025
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 05 May 2009 (05.05.2009)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference GNE-0206-1R1P1.PC	
International application No. PCT/US2007/085269	International filing date (day/month/year) 20 November 2007 (20.11.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address STAROVASNIK, Melissa 190 Dorantes Avenue San Francisco, CA 94116 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address STAROVASNIK, Melissa A. 190 Dorantes Avenue San Francisco, CA 94116 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Perez Roberto

e-mail pt09.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 09

Facsimile No. +41 22 338 71 30

Form PCT/IB/306 (January 2009)

I/D1QCZHSD0

Received

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2007/085269

LAN/JCT
GNE-0206 WO
PI

From the INTERNATIONAL BUREAU

Goodwin Procter LLP
Silicon Valley Office**PCT**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

DREGER, Ginger, R.
Goodwin Procter LLP
135 Commonwealth Drive
Menlo Park, CA 94025
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 07 April 2009 (07.04.2009)	
Applicant's or agent's file reference GNE-0206-1R1P1.PC	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2007/085269	International filing date (day/month/year) 20 November 2007 (20.11.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address ARNOTT, David 366 E. 40th Avenue San Mateo, CA 94403 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address ARNOTT, David, P. 366 E. 40th Avenue San Mateo, CA 94403 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:DOCKETED
MAY 04 2009

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Perez Reina Luis e-mail pt09.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 09
---	--

Facsimile No. +41 22 338 71 30

Form PCT/IB/306 (January 2009)

1/D0L6N4MT0

Received

43 17

From the INTERNATIONAL BUREAU

Goodwin Procter LLP
Silicon Valley Office**PCT**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

DREGER, Ginger, R.
Goodwin Procter LLP
135 Commonwealth Drive
Menlo Park, CA 94025
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 07 April 2009 (07.04.2009)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference GNE-0206-1R1P1.PC	
International application No. PCT/US2007/085269	International filing date (day/month/year) 20 November 2007 (20.11.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant

 ☒ the inventor

 ☐ the agent

 ☐ the common representative

Name and Address HASS, Philip 558 Sierra Street, Box 859 Moss Beach, CA 94038 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person

 ☒ the name

 ☐ the address

 ☐ the nationality

 ☐ the residence

Name and Address HASS, Philip, E. 558 Sierra Street, Box 859 Moss Beach, CA 94038 United States of America	State of Nationality US	State of Residence US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Perez Reina Luis

Facsimile No. +41 22 338 71 30

e-mail pt09.pct@wipo.int

Telephone No. +41 22 338 74 09