

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 710**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2001 E 01952183 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 1294765**

54 Título: **Uso de un anticuerpo específico para un polipéptido similar a IL-17**

30 Prioridad:

22.06.2000 US 213125 P

02.02.2001 US 266159 P

16.03.2001 US 810384

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

26.02.2014

73 Titular/es:

AMGEN, INC. (100.0%)

ONE AMGEN CENTER DRIVE

THOUSANDS OAKS, CA 91320-1799, US

72 Inventor/es:

MEDLOCK, EUGENE;

YEH, RICHARD;

SILBIGER, SCOTT M.;

ELLIOT, GARY S.;

NGUYEN, HUNG Q. y

JING, SHUQIAN

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 444 710 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de un anticuerpo específico para un polipéptido similar a IL-17

Campo de la invención

La presente invención se refiere a usos de anticuerpos específicos para polipéptidos similares a IL-17.

5 Antecedentes de la invención

Los avances técnicos en la identificación, clonación, expresión y manipulación de moléculas de ácido nucleico y el desciframiento del genoma humano han acelerado enormemente el descubrimiento de productos terapéuticos novedosos. Técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos rápidas pueden generar ahora información de secuencia a velocidades sin precedentes y, acopladas con análisis computacionales, permiten el ensamblaje de secuencias solapantes en genomas completos y parciales así como la identificación de regiones que codifican para polipéptidos. Una comparación de una secuencia de aminoácidos pronosticada frente a una compilación de base de datos de secuencias de aminoácidos conocidas permite determinar el grado de homología con secuencias identificadas previamente y/o puntos de referencia estructurales. La clonación y expresión de una región que codifica para un polipéptido de una molécula de ácido nucleico proporciona un producto polipeptídico para análisis estructurales y funcionales. La manipulación de moléculas de ácido nucleico y polipéptidos codificados puede conferir propiedades ventajosas a un producto para su uso como producto terapéutico.

A pesar de los avances técnicos significativos en la investigación del genoma a lo largo de la última década, el potencial de desarrollo de productos terapéuticos novedosos basados en el genoma humano está todavía en gran medida sin explotar. Muchos genes que codifican para productos terapéuticos polipeptídicos posiblemente beneficiosos o los que codifican para polipéptidos, que pueden actuar como "dianas" para moléculas terapéuticas, no se han identificado todavía.

Por consiguiente, es un objeto de la invención identificar polipéptidos novedosos, y moléculas de ácido nucleico que codifican para los mismos, que pueden tener beneficio de diagnóstico o terapéutico.

Sumario de la invención

25 La presente invención se refiere a usos para anticuerpos contra polipéptidos similares a IL-17 novedosos.

La invención proporciona un uso de un anticuerpo antagonista específico para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma que comprende 25, 50, 75, 100 ó 150 aminoácidos contiguos, para la preparación de un medicamento para tratar fibrosis quística, síndrome de enfermedad respiratoria aguda o enfisema.

30 La invención proporciona además un anticuerpo antagonista específico para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma que comprende 25, 50, 75, 100 ó 150 aminoácidos contiguos, para su uso en el tratamiento de fibrosis quística, síndrome de enfermedad respiratoria aguda o enfisema.

35 La invención proporciona además un uso de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista específico para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma que comprende 25, 50, 75, 100 ó 150 aminoácidos contiguos, y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable, para la preparación de un medicamento para tratar fibrosis quística, síndrome de enfermedad respiratoria aguda o enfisema.

40 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista específico para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma que comprende 25, 50, 75, 100 ó 150 aminoácidos contiguos, y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de fibrosis quística, síndrome de enfermedad respiratoria aguda o enfisema.

La presente solicitud da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 45 (a) la secuencia de nucleótidos tal como se expone en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 9;
- (b) una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10;
- (c) una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones moderada o altamente rigurosas con el complemento de (a) o (b), en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10; y
- 50 (d) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de (a) a (c).

ES 2 444 710 T3

La presente solicitud también da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

5 (a) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que es al menos aproximadamente el 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento idéntico al polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10;

10 (b) una secuencia de nucleótidos que codifica para una variante alélica o variante de corte y empalme de la secuencia de nucleótidos tal como se expone en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 9, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10;

(c) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 9, (a) o (b) que codifica para un fragmento de polipéptido de al menos aproximadamente 25 residuos de aminoácido, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10;

15 (d) una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 9, o (a) - (c) que comprende un fragmento de al menos aproximadamente 16 nucleótidos;

(e) una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones moderada o altamente rigurosas con el complemento de cualquiera de (a) - (d), en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10; y

(f) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de (a) - (d).

20 La presente solicitud da a conocer además una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10 con al menos una sustitución de aminoácido conservativa, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10;

25 (b) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10 con al menos una inserción de aminoácido, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10;

30 (c) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10 con al menos una delección de aminoácido, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10;

(d) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10 que tiene un truncamiento C- y/o N-terminal, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10;

35 (e) una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10 con al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos, truncamiento C-terminal y truncamiento N-terminal, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10;

40 (f) una secuencia de nucleótidos de (a) - (e) que comprende un fragmento de al menos aproximadamente 16 nucleótidos;

(g) una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones moderada o altamente rigurosas con el complemento de cualquiera de (a) - (f), en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10; y

(h) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de (a) - (e).

45 La presente solicitud también da a conocer un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una secuencia de aminoácidos que comprende el polipéptido similar a IL-17 humana madura contenido en SEQ ID NO: 2, y que comprende además opcionalmente una metionina amino terminal; o una secuencia de aminoácidos que comprende el polipéptido similar a IL-17 murina madura contenido en SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10;

50 (b) una secuencia de aminoácidos para un ortólogo de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10;

NO: 10;

5 (c) una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70, el 75, el 80, el 85, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2 SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10;

(d) un fragmento de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10 que comprende al menos aproximadamente 25 residuos de aminoácido, en el que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10;

10 (e) una secuencia de aminoácidos para una variante alélica o variante de corte y empalme de o bien la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10, o bien al menos una de (a) - (c) en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10.

La presente solicitud da a conocer además un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

15 (a) la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10 con al menos una sustitución de aminoácido conservativa, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10;

20 (b) la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10 con al menos una inserción de aminoácido, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10;

(c) la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10 con al menos una delección de aminoácido, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10;

25 (d) la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10 que tiene un truncamiento C- y/o N-terminal, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10; y

30 (e) la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10, con al menos una modificación seleccionada del grupo que consiste en sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos, truncamiento C-terminal y truncamiento N-terminal, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10.

También se dan a conocer polipéptidos de fusión que comprenden las secuencias de aminoácidos de (a) - (e) anteriores.

35 La presente solicitud también da a conocer un vector de expresión que comprende las moléculas de ácido nucleico aisladas tal como se expone en el presente documento, células huésped recombinantes que comprenden moléculas de ácido nucleico recombinantes tal como se expone en el presente documento y un método de producción de un polipéptido similar a IL-17 que comprende cultivar las células huésped y opcionalmente aislar el polipéptido así producido.

40 También se da a conocer un animal no humano transgénico que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido similar a IL-17. Las moléculas de ácido nucleico de polipéptido similar a IL-17 se introducen en el animal de una manera que permite la expresión y niveles aumentados del polipéptido similar a IL-17, lo que puede incluir niveles circulantes aumentados. El animal no humano transgénico es preferiblemente un mamífero.

También se dan a conocer derivados de los polipéptidos similares a IL-17 de la presente invención.

45 Se dan a conocer análogos de los polipéptidos similares a IL-17 en la presente solicitud que resultan de sustituciones de aminoácidos conservativas y/o no conservativas del polipéptido similar a IL-17 de SEQ ID NO: 2. Tales análogos incluyen un polipéptido similar a IL-17 en el que, por ejemplo, el aminoácido en la posición 67 de SEQ ID NO: 2 es asparagina o glutamina, el aminoácido en la posición 69 de SEQ ID NO: 2 es lisina, glutamina, asparagina o arginina, el aminoácido en la posición 94 de SEQ ID NO: 2 es cisteína, serina o alanina, el aminoácido en la posición 96 de SEQ ID NO: 2 es cisteína, serina o alanina, el aminoácido en la posición 101 de SEQ ID NO: 2 es isoleucina, metionina, leucina, fenilalanina, alanina, norleucina o valina, el aminoácido en la posición 104 de SEQ ID NO: 2 es treonina o serina, el aminoácido en la posición 129 de SEQ ID NO: 2 es cisteína, alanina o serina, el aminoácido en la posición 140 de SEQ ID NO: 2 es cisteína, alanina o serina, el aminoácido en la posición 152 de SEQ ID NO: 2 es cisteína, alanina o serina.

Se contemplan específicamente análogos, fragmentos o variantes de polipéptido similar a IL-17 que conservan la actividad de unión al receptor o la actividad biológica de citocinas. También se contemplan análogos, fragmentos o variantes de polipéptido similar a IL-17 que se unen al receptor pero no pueden transducir una señal.

5 También se dan a conocer composiciones farmacéuticas que comprenden los nucleótidos, polipéptidos o agentes de unión selectiva dados a conocer y uno o más agentes de formulación farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas se usan para proporcionar cantidades terapéuticamente eficaces de los nucleótidos o polipéptidos dados a conocer. También se dan a conocer métodos de uso de los polipéptidos y las moléculas de ácido nucleico. La invención se refiere a agentes de unión selectiva para su uso en el tratamiento de determinadas enfermedades, siendo los agentes de unión selectiva anticuerpos.

10 Los polipéptidos similares a IL-17, anticuerpos y derivados de los mismos dados a conocer, otros agentes de unión selectiva, moléculas pequeñas y moléculas de ácido nucleico (incluyendo ácidos nucleicos antisentido) pueden usarse para tratar, prevenir, mejorar y/o detectar enfermedades y trastornos, incluyendo los mencionados en el presente documento. Por ejemplo, los polinucleótidos y polipéptidos similares a IL-17 pueden tener actividad proinflamatoria y por tanto pueden desempeñar un papel en estados patológicos relacionados con inflamación. La expresión de polinucleótidos o polipéptidos similares a IL-17 puede desempeñar también un papel en la progresión del cáncer. Por ejemplo, un polinucleótido y polipéptido similar a IL-17 puede desempeñar un papel en estados de linfoma y el aumento de la expresión de un polinucleótido o polipéptido similar a IL-17 puede ser indicativo de un estado de prelinfoma. Puede ser deseable la disminución de la actividad o los niveles de polipéptido similar a IL-17 en estados patológicos inflamatorios crónicos o agudos, incluyendo enfermedades autoinmunitarias, y en estados patológicos de cáncer, incluyendo estados de linfoma o prelinfoma. A la inversa, puede ser deseable el aumento de la actividad de polipéptido similar a IL-17 en otros estados patológicos, tales como infección.

15 La presente solicitud también da a conocer un método para someter a ensayo moléculas de prueba para identificar una molécula de prueba que se une a un polipéptido similar a IL-17. El método comprende poner en contacto un polipéptido similar a IL-17 con una molécula de prueba para determinar el grado de unión de la molécula de prueba al polipéptido. El método comprende además determinar si tales moléculas de prueba son agonistas o antagonistas de un polipéptido similar a IL-17. La presente solicitud da a conocer además un método para someter a prueba el impacto de las moléculas sobre la expresión de un polipéptido similar a IL-17 o sobre la actividad de un polipéptido similar a IL-17.

20 Una realización da a conocer métodos de identificación de inhibidores de una interacción de un polipéptido similar a IL-17 con un polipéptido de RB-2 o RB-3 de receptor de IL-17. Estos métodos comprenden las etapas de detectar la unión de un polipéptido similar a IL-17 (tal como un polipéptido que comprende la secuencia de proteína madura expuesta en SEQ ID NO: 2 o fragmentos, análogos o variantes de la misma que conservan la actividad de unión a receptor) con un polipéptido RB-2 o RB-3 receptor de IL-17 (tal como un polipéptido que comprende la región extracelular de SEQ ID NO: 18 ó 20, o fragmentos, análogos o variantes de la misma que conservan la actividad de unión a ligando), en presencia y ausencia de un compuesto de prueba, e identificar el compuesto de prueba como inhibidor candidato cuando disminuye la unión en presencia del compuesto. Los compuestos de prueba adecuados incluyen moléculas de ácido nucleico, proteínas, péptidos, hidratos de carbono, lípidos, compuestos orgánicos e inorgánicos, de los cuales pueden examinarse bibliotecas usando procedimientos de examen de alto rendimiento. La presente invención proporciona anticuerpos antagonistas para su uso en el tratamiento de un estado patológico mediado por un polipéptido similar a IL-17, siendo dicho estado fibrosis quística, síndrome de enfermedad respiratoria aguda o enfisema. El anticuerpo antagonista puede administrarse a se une específicamente al polipéptido similar a IL-17. La solicitud también da a conocer un método de inhibición de la interacción no deseada de polipéptido similar a IL-17 con RB-2 o RB-3 receptor de IL-7 que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula que puede unirse al polipéptido similar a IL-17 o RB-2 o RB-3 receptor de IL-17.

25 Estos inhibidores candidatos identificados incluyen agentes de unión selectiva, fragmentos, análogos o variantes de polipéptidos similares a IL-17 de la presente invención y proteínas de fusión de los mismos. Se describen en detalle adicional en el presente documento estados patológicos mediados por polipéptido similar a IL-17.

30 La solicitud también da a conocer un método de inhibición de la interacción no deseada de polipéptido similar a IL-17 con RB-2 o RB-3 receptor de IL-17 que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula que puede unirse al polipéptido similar a IL-17 o RB-2 o RB-3 receptor de IL-17.

35 También se dan a conocer métodos de regulación de la expresión y modulación (es decir, aumento o disminución) de los niveles de un polipéptido similar a IL-17. Un método comprende administrar a un animal una molécula ácido nucleico que codifica para un polipéptido similar a IL-17 o moléculas de ácido nucleico antisentido (por ejemplo, que se unen específicamente a ADN o ARN que codifica para polipéptido similar a IL-17 o secuencias reguladoras e inhiben la expresión de polipéptido similar a IL-17). En otro método, puede administrarse una molécula de ácido nucleico que comprende elementos que regulan o modulan la expresión de un polipéptido similar a IL-17. Los ejemplos de estos métodos incluyen terapia génica, terapia celular y terapia antisentido tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Aún otros métodos para disminuir los niveles o la actividad de un polipéptido similar a IL-17 implican la administración de un agente de unión selectiva (tal como anticuerpos y

derivados de los mismos incluyendo anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente al polipéptido similar a IL-17 o sus sitios de unión a receptor) para antagonizar la actividad del polipéptido similar a IL-17. También se contempla la administración de un análogo, fragmento o variante de IL-17, incluyendo una proteína de fusión de la misma, que antagoniza la actividad de un polipéptido similar a IL-17 nativo.

En otra descripción, los polipéptidos similares a IL-17 pueden usarse para identificar receptores de los mismos ("receptores de polipéptido similar a IL-17"). Se han usado extensamente diversas formas de "clonación de expresión" para clonar receptores para ligandos proteicos. Véase por ejemplo, H. Simonsen y H.F. Lodish, Trends in Pharmacological Sciences, 15:437-441 (1994), y Tartaglia *et al.*, Cell, 83:1263-1271 (1995). El aislamiento del/de los receptor(es) de polipéptido similar a IL-17 es útil para identificar o desarrollar agonistas y antagonistas novedosos de la ruta de señalización del polipéptido similar a IL-17. Tales agonistas y antagonistas incluyen receptor(es) de polipéptido similar a IL-17 soluble(s) (por ejemplo fragmentos que carecen de toda o parte de la(s) región/regiones transmembrana y/o citoplasmática(s) o fragmentos de la(s) región/regiones extracelular(es) que conservan la actividad de unión a ligando, análogos o variantes de los mismos y fusiones de los mismos con polipéptidos heterólogos tales como dominios constantes de una inmunoglobulina o fragmentos o variantes de los mismos que conservan la capacidad para prolongar la semivida en circulación), agentes de unión selectiva anti-receptor de polipéptido similar a IL-17 (tales como anticuerpos y derivados de los mismos incluyendo anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente al polipéptido similar a receptor de IL-17 o sus sitios de unión a ligando), moléculas pequeñas y oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, que se unen específicamente a ADN o ARN que codifica para polipéptido similar a IL-17 o secuencias reguladoras e inhiben la expresión de polipéptido similar a IL-17), cualquiera de los cuales puede usarse para tratar una o más de las enfermedades o trastornos, incluyendo los mencionados en el presente documento. Por ejemplo, pueden administrarse antagonistas de polipéptido similar a IL-17 como producto terapéutico antiinflamatorio o usarse para tratar estados cancerosos o de linfoma.

Se han identificado en el ejemplo 8 dos receptores que se unen al polipéptido similar a IL-17 dado a conocer y se indican como IL-17RB-2 e IL-17RB-3.

Sus secuencias de nucleótidos y aminoácidos se exponen en SEQ ID NO: 17-18 (IL-17RB-2) y SEQ ID NO: 19-20 (IL-17RB-3), respectivamente. El dominio transmembrana pronosticado abarca los residuos 293 a 313 de SEQ ID NO: 18 y los residuos 351 a 371 de SEQ ID NO: 20. El péptido señal pronosticado abarca 14 residuos de SEQ ID NO: 18 y 20. Por tanto, la secuencia extracelular pronosticada abarca los aminoácidos 14 a 292 de SEQ ID NO: 18 y los aminoácidos 14 a 350 de SEQ ID NO: 20.

En determinadas realizaciones, un agonista o antagonista de polipéptido similar a IL-17 puede ser una proteína, un péptido, un hidrato de carbono, un lípido o una molécula de peso molecular pequeño que interacciona con un polipéptido similar a IL-17 para regular su actividad.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa una secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) que codifica para el polipéptido similar a IL-17 humana. También se representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) del polipéptido similar a IL-17 humana. En esta figura, el péptido señal pronosticado está subrayado; se cree que los aminoácidos 1 a 16 comprenden la secuencia líder.

La figura 2A-2C representa una secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 3) que codifica para el polipéptido similar a IL-17 de ratón. También se representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) del polipéptido similar a IL-17 de ratón. En esta figura, el péptido señal pronosticado está subrayado; se cree que los aminoácidos 1 a 18 comprenden la secuencia líder. La figura 2B-2C también representa la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 9) de una forma no secretada de ADNc de polipéptido similar a IL-17 de ratón, y la correspondiente secuencia de aminoácidos de la misma (SEQ ID NO: 10).

La figura 3A-3B representa un apilamiento de la secuencia de aminoácidos de polipéptido similar a IL-17, hIL-17L, (SEQ ID NO: 2) con la secuencia de aminoácidos de un miembro de la familia de IL-17 humana conocida, hIL-17, (SEQ ID NO: 5).

La figura 4 representa un apilamiento de la secuencia de aminoácidos de polipéptido similar a IL-17, hIL-17L, (SEQ ID NO: 2) con la secuencia de aminoácidos de un miembro de la familia de IL-20 humana conocida, hIL-20, (SEQ ID NO: 6).

La figura 5 representa un apilamiento de la secuencia de aminoácidos de polipéptido similar a IL-17, hIL-17L, (SEQ ID NO: 2) con la secuencia de aminoácidos de un miembro de la familia de IL-17 humana conocida, hIL-17b (SEQ ID NO: 7).

La figura 6A-6B representa un apilamiento de la secuencia de aminoácidos de polipéptido similar a IL-17, hIL-17L, (SEQ ID NO: 2) con la secuencia de aminoácidos de un miembro de la familia de IL-17 humana conocida, hIL-17c, (SEQ ID NO: 8).

- 5 La figura 7 representa una transferencia de tipo Northern que detecta la expresión del transgén que sobreexpresa polipéptido similar a IL-17 en ratones fundadores transgénicos sometidos a necropsia (n.^{os} 1, 16, 27, 29, 55, 61, 20, 52 y 66). Los ratones control (n.^{os} 2, 17, 53 y 65) son compañeros de camada no transgénicos. El carril marcado "bl" es un carril de blanco y el control positivo (+) era el ADNc de polipéptido similar a IL-17. La presencia de una banda de 0,54 kb es indicativa de expresión transgénica.
- 10 La figura 8 representa una transferencia de tipo Northern que detecta la expresión del transgén que sobreexpresa polipéptido similar a IL-17 en ratones fundadores transgénicos hepatectomizados (n.^{os} 10,11, 30, 31, 33, 37, 46, 67 y 68). Los ratones control (n.^{os} 32, 35, 36 y 45) son compañeros de camada no transgénicos. El carril marcado "MI" representa el fragmento de microinyección que se cargó como control positivo. La presencia de una banda de 0,54 kb es indicativa de expresión transgénica.
- 15 La figura 9 representa secciones teñidas con hematoxilina y eosina (A, B, G-J), B220 (C, D) y F4/80 (E, F) de ganglio linfático (A-H) o médula ósea (I, J) de ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 (B, D, F, H) o ratones control no transgénicos (A, C, E, G). Los paneles A-F ilustran que el ganglio linfático transgénico para polipéptido similar a IL-17 estaba notablemente alargado con su arquitectura normal alterada debido a un infiltrado celular marcado (asterisco en el panel B) que contenía grandes números de células de linfocitos B positivas para B220 (panel D) y algunos macrófagos que se teñían con F4/80. El panel H ilustra que este infiltrado celular también contenía numerosos eosinófilos (cabezas de flecha) así como células gigantes inflamatorias multinucleadas (flechas).
- 20 La figura 10 representa secciones teñidas con hematoxilina y eosina (A, B; E-I) y B220 (C, D) de ganglio linfático, médula ósea (A, B), bazo (C-F) y riñón (G-J) de ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 (B, D, F, H, J) o ratones control no transgénicos (A, C, E, G, I). El panel A ilustra hiperplasia mieloide eosinofílica marcada. El panel D ilustra hiperplasia linfóide con una predominancia de células B positivas para B220 (flechas) en el bazo de ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17, mientras que el panel F ilustra hiperplasia mieloide eosinofílica en la pulpa roja esplénica transgénica para polipéptido similar a IL-17 en comparación con la pulpa roja esplénica no transgénica (E). Los paneles H y J ilustran dilatación pélvica renal (flecha en H) con una infiltración inflamatoria eosinofílica marcada en la pelvis renal (pielonefritis, panel J).
- 25 La figura 11 representa un histograma de diagrama de barras que muestra un aumento significativo en los números absolutos de linfocitos B CD19+ en la sangre periférica de 4 de 9 ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 en comparación con los controles de compañeros de camada no transgénicos.
- 30 La figura 12 representa un histograma de diagrama de barras que muestra un aumento en los números absolutos de linfocitos B CD19+ en los bazos de 5 de 10 ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 en comparación con los controles de compañeros de camada no transgénicos.
- 35 La figura 13 representa un histograma de diagrama de barras que muestra una ligera disminución en los números absolutos de linfocitos B CD19+ en la médula ósea de ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 en comparación con los controles de compañeros de camada no transgénicos.
- 40 La figura 14 representa un histograma de diagrama de barras que muestra un aumento en los números absolutos de linfocitos T CD4+ en la sangre periférica de 4 de 9 ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 en comparación con los controles de compañeros de camada no transgénicos.
- 45 La figura 15 representa un histograma de diagrama de barras que muestra un aumento en los números absolutos de linfocitos T CD4+ en los bazos de ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 en comparación con los controles de compañeros de camada no transgénicos.
- 50 La figura 16 representa gráficos de dispersión representativos de los cambios que se producen en los ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 frente a sus controles de compañeros de camada no transgénicos. Los dos gráficos superiores marcados como "A" son gráficos de puntos de citometría de flujo de 2 colores en los que se representa el marcaje de CD45R+ y polipéptido similar a IL-17-Fc en sus respectivos ejes. El gráfico control "A" muestra una ausencia de células CD45R+/polipéptido similar a IL-17-Fc+ en la región R1 mientras que en el gráfico transgénico "A" esta población estaba presente en la región R1 y representaba el 8% de la población de granulocitos total. En el correspondiente gráfico de dispersión directa frente a lateral ("B" y "C") estas células se representan como puntos de color rosa. Esta población estaba ausente en el gráfico control "B".
- 55 La figura 17 representa gráficos de dispersión representativos de los cambios que se producen en los ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 frente a sus controles de compañeros de camada no transgénicos. Los dos gráficos superiores marcados como "A" son gráficos de puntos de citometría de flujo de 2 colores en los que se representa el marcaje de CD4 y polipéptido similar a IL-17-Fc en sus respectivos ejes. El gráfico control "A" muestra una ausencia de células CD4+/polipéptido similar a IL-17-Fc+ en la región R1, mientras que en el gráfico transgénico "A" esta población estaba presente en la región R1 y representaba el 14% de la población de granulocitos total. En los correspondientes gráficos de dispersión directa frente a lateral (tamaño frente a granularidad), en los ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 (B) estas células se ubican justo por encima de la región en la que se encuentran normalmente los granulocitos (puntos de color rojo). Estas células están ausentes en el gráfico control

“B”. Además, para los ratones transgénicos (A), hay un surgimiento de una población de células que no eran ni CD4+ ni polipéptido similar a IL-17-Fc+ (región R2) pero que tiene las propiedades de dispersión de los eosinófilos, localizándose a la izquierda de los granulocitos en el gráfico de dispersión directa frente a lateral “B” (puntos de color verde). Esta población estaba ausente en el gráfico control “B”.

5 La figura 18 representa un histograma de diagrama de barras que muestra un aumento en los números absolutos de células similares a granulocitos rhIL-17 like-Fc+/CD45R+ en la médula ósea de 5 de 10 ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 en comparación con los controles de compañeros de camada no transgénicos.

La figura 19 representa un histograma de diagrama de barras que muestra un aumento en los números absolutos de células similares a granulocitos rhIL-17 like-Fc+/CD4+ en la médula ósea de ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 en comparación con los controles de compañeros de camada no transgénicos.

10 La figura 20 representa un ejemplo de un gráfico de dispersión directa frente a lateral típico (tamaño frente a granularidad). Las células en la compuerta pueden clasificarse para dar una población purificada.

La figura 21A-21B representa perfiles de FACS de ratones transgénicos que sobreexpresan polipéptido similar a IL-17 y controles no transgénicos de expresión de CD5, CD34 y CD4 en células de tejidos linfoides especificados. Los porcentajes incluían la referencia a poblaciones dobles positivas. Los números absolutos de células para poblaciones de eosinófilos CD5+CD19+, CD34+CD19+ y CD4+ se representan como tanto por ciento de poblaciones (para linfocitos) y número de células absoluto (eosinófilos).

Descripción detallada de la invención

Los encabezamientos de sección usados en el presente documento son sólo para fines de organización.

20 Definiciones

Los términos “gen de polipéptido similar a IL-17” o “molécula de ácido nucleico de polipéptido similar a IL-17” o “polinucleótido” se refieren a una molécula de ácido nucleico que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos tal como se expone en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 9, una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10, y moléculas de ácido nucleico tal como se definen en el presente documento.

El término “polipéptido similar a IL-17” se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10, y polipéptidos relacionados. Los polipéptidos relacionados incluyen: variantes alélicas de polipéptido similar a IL-17, ortólogos de polipéptido similar a IL-17, variantes de corte y empalme de polipéptido similar a IL-17, variantes de polipéptido similar a IL-17 y derivados de polipéptido similar a IL-17. Los polipéptidos similares a IL-17 pueden ser polipéptidos maduros, tal como se definen en el presente documento, y pueden tener o no un residuo de metionina amino terminal, dependiendo del método mediante el que se preparan.

El término “variante alélica de polipéptido similar a IL-17” se refiere a una de las varias posibles formas alternativas que se producen de manera natural de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma de un organismo o una población de organismos.

El término “derivados de polipéptido similar a IL-17” se refiere al polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10, variantes alélicas de polipéptido similar a IL-17, ortólogos de polipéptido similar a IL-17, variantes de corte y empalme de polipéptido similar a IL-17 o variantes de polipéptido similar a IL-17, tal como se definen en el presente documento, que se han modificado químicamente.

El término “fragmento de polipéptido similar a IL-17” se refiere a un polipéptido que comprende un truncamiento en el extremo amino terminal (con o sin una secuencia líder) y/o un truncamiento en el extremo carboxilo terminal del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10, variantes alélicas de polipéptido similar a IL-17, ortólogos de polipéptido similar a IL-17, variantes de corte y empalme de polipéptido similar a IL-17 y/o una variante de polipéptido similar a IL-17 que tiene una o más adiciones o sustituciones o deleciones internas de aminoácidos (en las que el polipéptido resultante tiene al menos seis (6) aminoácidos o más de longitud) en comparación con la secuencia de aminoácidos de polipéptido similar a IL-17 expuesta en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10. Los fragmentos de polipéptido similar a IL-17 pueden resultar de corte y empalme de ARN alternativo o de actividad proteasa *in vivo*. En realizaciones preferidas, los truncamientos comprenden aproximadamente 10 aminoácidos, o aproximadamente 20 aminoácidos, o aproximadamente 50 aminoácidos, o aproximadamente 75 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos o más de aproximadamente 100 aminoácidos. Los fragmentos de polipéptido así producidos comprenderán aproximadamente 25 aminoácidos contiguos, o aproximadamente 50 aminoácidos, o aproximadamente 75 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos, o aproximadamente 150 aminoácidos, o aproximadamente 200 aminoácidos. Tales fragmentos de polipéptido similar a IL-17 pueden comprender opcionalmente un residuo de metionina amino terminal. Se apreciará que tales fragmentos pueden usarse, por ejemplo, para generar anticuerpos frente a polipéptidos similares a IL-17.

- 5 El término “polipéptido de fusión similar a IL-17” se refiere a una fusión de uno o más aminoácidos (tal como un péptido o polipéptido heterólogo) en el extremo amino o carboxilo terminal del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10, variantes alélicas de polipéptido similar a IL-17, ortólogos de polipéptido similar a IL-17, variantes de corte y empalme de polipéptido similar a IL-17 o variantes de polipéptido similar a IL-17 que tienen una o más deleciones, sustituciones o adiciones internas de aminoácidos, en comparación con la secuencia de aminoácidos de polipéptido similar a IL-17 expuesta en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10.
- 10 El término “ortólogo de polipéptido similar a IL-17” se refiere a un polipéptido de otra especie que corresponde a una secuencia de aminoácidos de polipéptido similar a IL-17 tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10. Por ejemplo, polipéptidos similares a IL-17 de ratón y ser humano se consideran ortólogos entre sí.
- El término “variante de corte y empalme de polipéptido similar a IL-17” se refiere a una molécula de ácido nucleico, habitualmente ARN, que se genera mediante el procesamiento alternativo de secuencias de intrones en un transcrito de ARN de la secuencia de aminoácidos de polipéptido similar a IL-17 tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10.
- 15 El término “variantes de polipéptido similar a IL-17” se refiere a polipéptidos similares a IL-17 que comprenden secuencias de aminoácidos que tienen una o más sustituciones, deleciones (tal como deleciones internas y/o fragmentos de polipéptido similar a IL-17) y/o adiciones (tal como adiciones internas y/o polipéptidos de fusión similares a IL-17) de secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de polipéptido similar a IL-17 expuesta en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10 (con o sin una secuencia líder). Pueden producirse variantes de manera natural (por ejemplo, variantes alélicas de polipéptido similar a IL-17, ortólogos de polipéptido similar a IL-17 y variantes de corte y empalme de polipéptido similar a IL-17) o pueden construirse artificialmente. Tales variantes de polipéptido similar a IL-17 pueden prepararse a partir de las moléculas de ácido nucleico correspondientes que tienen una secuencia de ADN que varía por consiguiente con respecto a la secuencia de ADN tal como se expone en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 9. En realizaciones preferidas, las variantes tienen desde 1 hasta 3, o desde 1 hasta 5, o desde 1 hasta 10, o desde 1 hasta 15, o desde 1 hasta 20, o desde 1 hasta 25, o desde 1 hasta 50, o desde 1 hasta 75, o desde 1 hasta 100, o más de 100 sustituciones, inserciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos, pudiendo ser las sustituciones conservativas o no conservativas, o cualquier combinación de las mismas.
- 20 El término “antígeno” se refiere a una molécula o una parte de una molécula que pueden unirse mediante un agente de unión selectiva, tal como un anticuerpo, y que puede usarse adicionalmente en un animal para producir anticuerpos que pueden unirse a un epítipo de cada antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítopos.
- 25 El término “polipéptidos similares a IL-17 biológicamente activos” se refiere a polipéptidos similares a IL-17 que tienen al menos una actividad característica del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10.
- 30 Los términos “cantidad eficaz” y “cantidad terapéuticamente eficaz” se refieren cada uno a la cantidad de un polipéptido similar a IL-17 o molécula de ácido nucleico de polipéptido similar a IL-17 usada para soportar un nivel observable de una o más actividades biológicas de los polipéptidos similares a IL-17 tal como se expone en el presente documento.
- 35 El término “vector de expresión” se refiere a un vector que es adecuado para su uso en una célula huésped y contiene secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan la expresión de secuencias de ácido nucleico heterólogas. La expresión incluye, pero no se limita a, procesos tales como transcripción, traducción y corte y empalme del ARN, si hay intrones presentes.
- 40 El término “célula huésped” se usa para referirse a una célula que se ha transformado, o que puede transformarse con una secuencia de ácido nucleico y entonces expresar un gen de interés seleccionado. El término incluye la progenie de la célula antecesora, sea o no la progenie idéntica en morfología o en constitución genética al antecesor original, siempre que esté presente el gen seleccionado.
- 45 El término “identidad” tal como se conoce en la técnica se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas de polipéptido o dos o más moléculas de ácido nucleico, tal como se determina comparando las secuencias. En la técnica, “identidad” también significa el grado de parentesco de secuencia entre moléculas de ácido nucleico o polipéptidos, como puede ser el caso, tal como se determina mediante la coincidencia entre hebras de dos o más secuencias de nucleótidos o dos o más secuencias de aminoácidos. La “identidad” mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con alineamientos de huecos (si hay alguno) tratado mediante un programa informático o modelo matemático particular (es decir, “algoritmos”).
- 50 El término “similitud” es un concepto relacionado pero, al contrario que la “identidad”, se refiere a una medida de similitud que incluye tanto coincidencias idénticas como coincidencias de sustitución conservativa. Si dos secuencias de polipéptidos tiene, por ejemplo, 10/20 aminoácidos idénticos, y el resto son todos sustituciones no conservativas, entonces el porcentaje de identidad y similitud serían ambos del 50%. Si, en el mismo ejemplo, hay cinco posiciones más en las que hay sustituciones conservativas, entonces el porcentaje de identidad sigue siendo del 50%, pero el
- 55

porcentaje de similitud sería del 75% (15/20). Por tanto, en casos en los que haya sustituciones conservativas, el grado del porcentaje de similitud entre dos polipéptidos será superior que el porcentaje de identidad entre esos dos polipéptidos.

5 El término “molécula de ácido nucleico aislada” se refiere a una molécula de ácido nucleico de la invención que (1) se ha separado de al menos aproximadamente el 50 por ciento de las proteínas, los lípidos, los hidratos de carbono u otros materiales con los que se encuentra de manera natural cuando se aísla el ADN total de las células fuente, (2) no está unida a toda o una parte de un polinucleótido al que la “molécula de ácido nucleico aislada” está unida en la naturaleza, (3) está operativamente unida a un polinucleótido al que no está unida en la naturaleza, o (4) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia de nucleótidos más grande. Preferiblemente, la molécula de
10 ácido nucleico aislada de la presente invención está sustancialmente libre de cualquier otra molécula contaminante de ácido nucleico u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que interferirían con su uso en la producción de polipéptidos o su uso terapéutico, de diagnóstico, profiláctico o de investigación.

15 El término “polipéptido aislado” se refiere a un polipéptido de la presente invención que (1) se ha separado de al menos aproximadamente el 50 por ciento de los polinucleótidos, los lípidos, los hidratos de carbono u otros materiales con los que se encuentra de manera natural cuando se aísla de la célula fuente, (2) no está unido (mediante interacción covalente o no covalente) a todo o una parte de un polipéptido al que el “polipéptido aislado” está unido en la naturaleza, (3) está operativamente unido (mediante interacción covalente o no covalente) a un polipéptido al que no está unido en la naturaleza, o (4) no se produce en la naturaleza. Preferiblemente, el
20 polipéptido aislado está sustancialmente libre de cualquier otro polipéptido contaminante u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que interferirían con su uso terapéutico, de diagnóstico, profiláctico o de investigación.

25 El término “polipéptido similar a IL-17 madura” se refiere a un polipéptido similar a IL-17 que carece de una secuencia líder. Un polipéptido similar a IL-17 madura también puede incluir otras modificaciones tales como procesamiento proteolítico del extremo amino terminal (con o sin una secuencia líder) y/o el extremo carboxilo terminal, escisión de un polipéptido más pequeño a partir de un precursor más grande, glicosilación unida a N y/u O, y similares. Un polipéptido similar a IL-17 humana madura a modo de ejemplo puede encontrarse dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Un polipéptido similar a IL-17 de ratón madura a modo de ejemplo puede encontrarse dentro de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 10. Los términos
30 “secuencia de ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” se refieren a secuencia de ADN o ARN. Los términos abarcan moléculas formadas a partir de cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN tales como, pero sin limitarse a 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinil-citosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-iso-penteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetil-guanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiamino-metil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarbonil-metiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metilto-N6-isopenteniladenina, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutóxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina.

40 El término “que se produce de manera natural” o “nativo” cuando se usan junto con materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células huésped, y similares, se refiere a materiales que se encuentran en la naturaleza y no están manipulados por el hombre. De manera similar, “que no se produce de manera natural” o “no nativo” tal como se usa en el presente documento se refiere a un material que no se encuentra en la naturaleza o que se ha modificado estructuralmente o sintetizado por el hombre.

45 El término “operativamente unido” se usa en el presente documento para referirse a un método de secuencias flanqueantes en el que las secuencias flanqueantes así descritas están configuradas o ensambladas para realizar su función habitual. Por tanto, una secuencia flanqueante operativamente unida a una secuencia codificante puede ser capaz de efectuar la replicación, transcripción y/o traducción de la secuencia codificante. Por ejemplo, una secuencia codificante está operativamente unida a un promotor cuando el promotor puede dirigir la transcripción de
50 esa secuencia codificante. Una secuencia flanqueante no necesita estar contigua a la secuencia codificante, siempre que funcione correctamente. Por tanto, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias transcritas aún no traducidas intermedias entre una secuencia promotora y la secuencia codificante, y la secuencia promotora todavía puede considerarse “operativamente unida” a la secuencia codificante.

55 Los términos “portador farmacéuticamente aceptable” o “portador fisiológicamente aceptable” tal como se usan en el presente documento se refieren a uno o más materiales de formulación adecuados para lograr o potenciar la administración del polipéptido similar a IL-17, molécula de ácido nucleico de polipéptido similar a IL-17 o agente de unión selectiva a polipéptido similar a IL-17 como una composición farmacéutica.

60 El término “agente de unión selectiva” se refiere a una molécula o moléculas que tienen especificidad para un polipéptido similar a IL-17. Tal como se usan en el presente documento los términos, “específico” y “especificidad” se refieren a la capacidad de los agentes de unión selectiva para unirse a polipéptidos similares a IL-17 humana y para

no unirse a polipéptidos no similares a IL-17 humana.

Sin embargo, se apreciará que los agentes de unión selectiva también pueden unirse a ortólogos del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10, es decir, versiones interespecie de los mismos, tales como polipéptidos de ratón y de rata.

- 5 El término “transducción” se usa para referirse a la transferencia de genes de una bacteria a otra, habitualmente mediante un fago. “Transducción” también se refiere a la adquisición y transferencia de secuencias celulares eucariotas por retrovirus.

10 El término “transfección” se usa para referirse a la captación de ADN foráneo o exógeno por una célula, y una célula se ha “transfectado” cuando el ADN exógeno se ha introducido dentro de la membrana celular. Se conocen bien en la técnica varias técnicas de transfección y se dan a conocer en el presente documento. Véanse, por ejemplo, Graham *et al.*, *Virology*, 52:456 (1973); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, (1989); Davis *et al.*, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, (1986); y Chu *et al.*, *Gene*, 13:197 (1981). Tales técnicas pueden usarse para introducir uno o más restos de ADN exógeno en células huésped adecuadas.

15 El término “transformación” tal como se usa en el presente documento se refiere a un cambio en las características genéticas de una célula, y una célula se ha transformado cuando se ha modificado para contener nuevo ADN. Por ejemplo, una célula se transforma cuando se modifica genéticamente con respecto a su estado nativo. Tras la transfección o transducción, el ADN transformante puede recombinarse con el de la célula integrándose físicamente en un cromosoma de la célula, puede mantenerse de manera transitoria como un elemento episomal sin replicarse, 20 o puede replicarse independientemente como un plásmido. Se considera que una célula se ha transformado de manera estable cuando el ADN se replica con la división de la célula.

El término “vector” se usa para referirse a cualquier molécula (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido o virus) usada para transferir la información codificante a una célula huésped.

Parentesco de moléculas de ácido nucleico y/o polipéptidos

25 Se entiende que las moléculas de ácido nucleico relacionadas incluyen variantes alélicas o de corte y empalme de la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 9, e incluyen secuencias que son complementarias a cualquiera de las secuencias de nucleótidos anteriores. Las moléculas de ácido nucleico relacionadas también incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que comprende o 30 consiste esencialmente en una sustitución, modificación, adición y/o delección de uno o más residuos de aminoácido en comparación con el polipéptido en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10.

Los fragmentos incluyen moléculas que codifican para un polipéptido de al menos aproximadamente 25 residuos de aminoácido, o aproximadamente 50, o aproximadamente 75, o aproximadamente 100, o de más de aproximadamente 100, residuos de aminoácido del polipéptido de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10.

35 Además, las moléculas de ácido nucleico de polipéptido similar a IL-17 relacionadas incluyen las moléculas que comprenden secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones moderada o altamente rigurosas tal como se definen en el presente documento con la secuencia completamente complementaria de la molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 9, o de una molécula que codifica para un polipéptido, polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o 40 SEQ ID NO: 10, o de un fragmento de ácido nucleico tal como se define en el presente documento, o de un fragmento de ácido nucleico que codifica para un polipéptido tal como se define en el presente documento. Pueden prepararse sondas de hibridación usando las secuencias de polipéptido similar a IL-17 proporcionadas en el presente documento para examinar bibliotecas de ADN genómico o sintético, ADNc, para determinar secuencias relacionadas. Se determinan fácilmente regiones de la secuencia de ADN y/o de aminoácidos de polipéptido similar a IL-17 que presentan identidad significativa con secuencias conocidas usando algoritmos de alineación de 45 secuencias tal como se describe en el presente documento, y esas regiones pueden usarse para diseñar sondas para el examen.

El término “condiciones altamente rigurosas” se refiere a las condiciones que se diseñan para permitir la hibridación de hebras de ADN cuyas secuencias son altamente complementarias, y para excluir la hibridación de ADN apareados de manera errónea significativamente. La rigurosidad de la hibridación se determina principalmente 50 mediante la temperatura, fuerza iónica y la concentración de agentes de desnaturalización tales como formamida. Ejemplos de “condiciones altamente rigurosas” para hibridación y lavado son cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a 65-68°C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M y formamida al 50% a 42°C. Véanse Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridation: a practical approach*, cap. 4, IRL Press Limited, Oxford, Inglaterra (1999).

También pueden usarse condiciones más rigurosas (tales como temperatura superior, fuerza iónica inferior, contenido en formamida superior u otro agente de desnaturalización); sin embargo, la tasa de hibridación se verá

- afectada. Pueden incluirse otros agentes en los tampones de hibridación y lavado con el fin de reducir la hibridación no específica y/o de fondo. Ejemplos son albúmina sérica bovina al 0,1%, polivinilpirrolidona al 0,1%, pirofosfato de sodio al 0,1%, dodecilsulfato de sodio al 0,1% (NaDodSO₄ o SDS), Ficoll, solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (u otro ADN no complementario) y sulfato de dextrano, aunque también pueden usarse otros agentes adecuados. La concentración y los tipos de estos aditivos pueden cambiarse sin afectar sustancialmente a la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Los experimentos de hibridación se llevan a cabo habitualmente a pH 6,8-7,4; sin embargo, a condiciones de fuerza iónica típicas, la tasa de hibridación es casi independiente del pH. Véase Anderson *et al.*, citado anteriormente.
- Los factores que afectan a la estabilidad de un dúplex de ADN incluyen la composición de bases, la longitud y el grado de apareamiento erróneo de pares de bases. El experto en la técnica puede ajustar las condiciones de hibridación con el fin de adaptar estas variables y permitir que ADN de diferente parentesco de secuencia formen híbridos. La temperatura de fusión de un dúplex de ADN perfectamente apareado puede estimarse mediante la siguiente ecuación:
- $$T_m (\text{°C}) = 81,5 + 16,6 (\log[\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{ de G+C}) - 600/N - 0,72 (\% \text{ de formamida})$$
- en la que N es la longitud del dúplex formado, [Na⁺] es la concentración molar del ión sodio en la disolución de hibridación o lavado, % de G+C es el porcentaje de bases (guanina+citosina) en el híbrido. Para híbridos apareados de manera imperfecta, la temperatura de fusión se reduce en aproximadamente 1°C por cada 1% de apareamiento erróneo.
- El término “condiciones moderadamente rigurosas” se refiere a condiciones en las que puede formarse un dúplex de ADN con un mayor grado de apareamiento erróneo de pares de bases del que podría producirse en “condiciones altamente rigurosas”. Ejemplos de “condiciones moderadamente rigurosas” típicas son cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a 50-65°C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M y formamida al 20% a 37-50°C. A modo de ejemplo, una condición “moderadamente rigurosa” de 50°C en ión sodio 0,015 M permitirá aproximadamente un apareamiento erróneo del 21%.
- Los expertos en la técnica apreciarán que no existe una distinción absoluta entre condiciones “altamente” y “moderadamente” rigurosas. Por ejemplo, a ión sodio 0,015 M (sin formamida), la temperatura de fusión de ADN largo perfectamente apareado es de aproximadamente 71°C. Con un lavado a 65°C (a la misma fuerza iónica), esto permitirá aproximadamente un apareamiento erróneo del 6%. Para capturar secuencias relacionadas más distantemente, un experto en la técnica puede simplemente disminuir la temperatura o aumentar la fuerza iónica.
- Se proporciona una buena estimación de la temperatura de fusión en NaCl* 1 M para sondas oligonucleotídicas de hasta aproximadamente 20 nt mediante:
- $$T_m = 2^\circ\text{C por par de bases A-T} + 4^\circ\text{C por par de bases G-C}$$
- *La concentración de ión sodio en sal citrato de sodio (SSC) 6X es 1 M. Véase Suggs *et al.*, *Developmental Biology Using Purified Genes*, pág. 683, Brown and Fox (eds.) (1981).
- Condiciones de lavado de rigurosidad alta para oligonucleótidos son habitualmente a una temperatura de 0-5°C por debajo de la T_m del oligonucleótido en SSC 6X, SDS al 0,1%.
- En otra realización, las moléculas de ácido nucleico relacionadas comprenden o consisten en una secuencia de nucleótidos que es aproximadamente el 70 por ciento (70%) idéntica a la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 9, o comprenden o consisten esencialmente en una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que es aproximadamente el 70 por ciento (70%) idéntica al polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10. En realizaciones preferidas, las secuencias de nucleótidos son aproximadamente el 75 por ciento, o aproximadamente el 80 por ciento, o aproximadamente el 85 por ciento, o aproximadamente el 90 por ciento, o aproximadamente el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99 por ciento idénticas a la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 9, o las secuencias de nucleótidos codifican para un polipéptido que es aproximadamente el 75 por ciento, o aproximadamente el 80 por ciento, o aproximadamente el 85 por ciento, o aproximadamente el 90 por ciento, o aproximadamente el 95, el 96, el 91, el 98 o el 99 por ciento idéntico a la secuencia de polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10.
- Las diferencias en la secuencia de ácido nucleico pueden dar como resultado modificaciones conservativas y/o no conservativas de la secuencia de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10.
- Las modificaciones conservativas en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10 (y las modificaciones correspondientes en los nucleótidos codificantes) producirán polipéptidos similares a IL-17 que tienen características funcionales y químicas similares a las de un polipéptido similar a IL-17 que se produce de manera natural. Por el contrario, pueden lograrse modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o químicas de polipéptidos similares a IL-17 seleccionando sustituciones en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10 que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la estructura principal molecular en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o de hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral.

5 Por ejemplo, una “sustitución de aminoácido conservativa” puede implicar una sustitución de un residuo de aminoácido nativo por un residuo no nativo de manera que hay poco o ningún efecto sobre la polaridad o carga del residuo de aminoácido en esa posición. Además, cualquier residuo nativo en el polipéptido también puede sustituirse por alanina, tal como se ha descrito anteriormente para la “mutagénesis por exploración de alanina”.

10 Sustituciones de aminoácidos conservativas también abarcan residuos de aminoácido que no se producen de manera natural que se incorporan normalmente mediante síntesis química de péptidos en lugar de mediante síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen peptidomiméticos y otras formas revertidas o invertidas de restos de aminoácido.

Los residuos que se producen de manera natural pueden dividirse en clases basadas en propiedades de la cadena lateral comunes:

1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

15 2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

3) ácidos: Asp, Glu;

4) básicos: His, Lys, Arg;

5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro; y

6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

20 Por ejemplo, las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Tales residuos sustituidos pueden introducirse en regiones del polipéptido similar a IL-17 humana que son homólogas con ortólogos de polipéptido similar a IL-17 no humana, o en las regiones no homólogas de la molécula.

25 Para realizar tales cambios, puede considerarse el índice hidropático de aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en sus características de hidrofobicidad y carga. Son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

30 Se entiende en la técnica la importancia del índice hidropático de aminoácidos para conferir función biológica interactiva en una proteína. Kyte *et al.*, J. Mol. Biol., 157:105-131 (1982). Se sabe que determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen una puntuación o índice hidropático similar y todavía conservan una actividad biológica similar. Para realizar cambios basándose en el índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , se prefieren particularmente los que están dentro de ± 1 e incluso se prefieren más particularmente los que están dentro de $\pm 0,5$.

35 También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente basándose en la hidrofiliidad, particularmente cuando la proteína o el péptido equivalente biológicamente funcional creado de ese modo está destinado para su uso en realizaciones inmunológicas, como en el presente caso. La mayor hidrofobicidad promedio local de una proteína, tal como se rige por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

40 Los siguientes valores de hidrofiliidad se han asignado a estos residuos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 \pm 1); glutamato (+3,0 \pm 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 \pm 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) y triptófano (-3,4). Para realizar cambios basándose en valores de hidrofiliidad similares, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ± 2 , se prefieren particularmente los que están dentro de ± 1 , e incluso se prefieren más particularmente los que están dentro de $\pm 0,5$. También pueden identificarse epítopos a partir de secuencias de aminoácidos primarias basándose en la hidrofiliidad. Estas regiones también se denominan “regiones de núcleo epitópico”.

50 Los expertos en la técnica pueden determinar sustituciones de aminoácidos deseadas (ya sean conservativas o no conservativas) en el momento en el que se deseen tales sustituciones. Por ejemplo, pueden usarse sustituciones de aminoácidos para identificar residuos importantes del polipéptido similar a IL-17, o para aumentar o disminuir la afinidad de los polipéptidos similares a IL-17 descritos en el presente documento.

Se exponen en la tabla I sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo.

Tabla I

Sustituciones de aminoácidos

Residuos originales	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, ácido 1,4-diamino-butírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Un experto en la técnica podrá determinar variantes adecuadas del polipéptido tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10 usando técnicas bien conocidas. Para identificar zonas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir la actividad, un experto en la técnica puede seleccionar como diana zonas que no se cree que sean importantes para la actividad. Por ejemplo, cuando se conocen polipéptidos similares con actividades similares de la misma especie o de otra especie, el experto en la técnica puede comparar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido similar a IL-17 con tales polipéptidos similares. Con una comparación de este tipo, pueden identificarse residuos y partes de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. Se apreciará que cambios en zonas de un polipéptido similar a IL-17 que no se conservan en relación con tales polipéptidos similares será menos probable que afecten de manera adversa a la actividad biológica y/o a la estructura del polipéptido similar a IL-17. El experto en la técnica también sabrá que, incluso en regiones relativamente conservadas, pueden sustituirse aminoácidos químicamente similares por los residuos que se producen de manera natural manteniendo al mismo tiempo la actividad (sustituciones de residuos de aminoácido conservativas). Por tanto, incluso zonas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden someterse a sustituciones conservativas de aminoácidos sin destruir la actividad biológica o sin afectar de manera adversa a la estructura del polipéptido.

Adicionalmente, un experto en la técnica puede revisar estudios de estructura-función que identifican residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o estructura. En vista de una comparación de este tipo, puede pronosticarse la importancia de los residuos de aminoácido en un polipéptido similar a IL-17 que se corresponden con residuos de aminoácido que son importantes para la actividad o la estructura en polipéptidos similares. Un experto en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para tales residuos de aminoácido importantes pronosticados de polipéptidos similares a IL-17.

Un experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con esa estructura en polipéptidos similares. En vista de tal información, un experto en la técnica puede pronosticar la alineación de residuos de aminoácido de un polipéptido similar a IL-17 con respecto a su estructura tridimensional. Un experto en la técnica puede elegir no realizar cambios de radicales en residuos de aminoácido que se pronostica que están en la superficie de la proteína, puesto que tales residuos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un experto en la técnica puede generar variantes de prueba que contienen una sustitución de un único aminoácido en cada residuo de aminoácido deseado. Entonces pueden seleccionarse las variantes usando ensayos de actividad conocidos por los expertos en la técnica. Tales variantes podrían usarse para reunir información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio en un residuo de aminoácido particular dio como resultado actividad destruida, reducida de manera no deseada o inadecuada, se evitarían las variantes con un cambio de este tipo. En otras palabras, basándose en la información reunida a partir de tales experimentos de rutina, un experto en la técnica puede determinar fácilmente los aminoácidos en los que deben evitarse sustituciones adicionales o bien solas o bien en combinación con otras mutaciones.

Varias publicaciones científicas se han dedicado a la predicción de la estructura secundaria. Véanse Moulton J., *Curr. Op. in Biotech.*, 7(4): 422-427 (1996), Chou *et al.*, *Biochemistry*, 13 (2): 222-245 (1974); Chou *et al.*, *Biochemistry*,

113 (2): 211-222 (1974); Chou *et al.*, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47: 45-148 (1978); Chou *et al.*, Ann. Rev. Biochem., 47:251-276 y Chou *et al.*, Biophys. J., 26: 367-384 (1979). Además, actualmente están disponibles programas informáticos para ayudar en la predicción de la estructura secundaria. Un método de predicción de la estructura secundaria se basa en el modelado de homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de secuencia de más del 30%, o similitud mayor del 40% a menudo tienen topologías estructurales similares. El reciente aumento de la base de datos estructurales de proteínas (PDB) ha proporcionado una predictibilidad potenciada de la estructura secundaria, incluyendo el posible número de pliegues dentro de la estructura de un polipéptido o una proteína. Véase Holm *et al.*, Nucl. Acid. Res., 27 (1): 244-247 (1999). Se ha sugerido (Brenner *et al.*, Curr. Op. Struct. Biol., 7(3): 369-376 (1997)) que hay un número limitado de pliegues en una proteína o polipéptido dado y que una vez se ha resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural se volverá drásticamente más precisa.

Métodos adicionales de predicción de la estructura secundaria incluyen "reconocimiento de plegamiento" (Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3): 311-81 (1997); Sippl *et al.*, Structure, 4(1): 15-19 (1996)), "análisis del perfil" (Bowie *et al.*, Science, 253: 164-170 (1991); Gribskov *et al.*, Met. Enzym., 183: 146-159 (1990); Gribskov *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 84 (13): 4355-4358 (1987)) y "vínculo evolutivo" (Véase Holm, citado anteriormente (1999), y Brenner, citado anteriormente (1997)).

Pueden determinarse análogos de polipéptido similar a IL-17 de la invención comprando la secuencia de aminoácidos de polipéptido similar a IL-17 con miembros de la familia relacionados. Miembros de la familia relacionados con el polipéptido similar a IL-17 a modo de ejemplo son IL-17 humana (SEQ ID NO: 5), IL-20 humana (SEQ ID NO: 6), IL-17B humana (SEQ ID NO: 7) e IL-17C humana (SEQ ID NO: 8). Esta comparación puede lograrse usando un alineamiento Pileup (Wisconsin GCG Program Package) o una comparación equivalente (solapamiento) con múltiples miembros de la familia dentro de regiones conservadas y no conservadas.

Tal como se muestra en la figura 5, la secuencia de aminoácidos pronosticada de polipéptido similar a IL-17 humana (que representa los aminoácidos 37 a 160 de SEQ ID NO: 2) se alinea con una IL-17B humana conocida (SEQ ID NO: 7). Pueden determinarse otros análogos de polipéptido similar a IL-17 usando este y otros métodos conocidos por los expertos en la técnica. Estas secuencias solapantes proporcionan orientación para sustituciones de aminoácidos conservativas y no conservativas dando como resultado análogos de polipéptido similar a IL-17 adicionales. Se apreciará que estas sustituciones de aminoácidos pueden consistir en aminoácidos que se producen de manera natural o que no se producen de manera natural. Por ejemplo, tal como se representa en la figura 5, la alineación de los miembros de la familia relacionados indica que los posibles análogos de polipéptido similar a IL-17 pueden tener el residuo Asn en la posición 67 de SEQ ID NO: 2 (posición 101 en la figura 5) sustituido por un residuo de Gln, el residuo de Arg en la posición 69 de SEQ ID NO: 2 (posición 103 en la figura 5) sustituido por un residuo de Lys, Gln o Asn y/o el residuo de Cys en la posición 94 de SEQ ID NO: 2 (posición 128 en la figura 5) sustituido por un residuo de Ser o Ala. Además, los posibles análogos de polipéptido similar a IL-17 pueden tener el residuo de Cys en la posición 96 de SEQ ID NO: 2 (posición 130 en la figura 5) sustituido por un residuo de Ala o Ser, el residuo de Val en la posición 101 de SEQ ID NO: 2 (posición 132 en la figura 5) sustituido por un residuo de He, Leu, Met, Phe, Ala o norleucina, el residuo de Thr en la posición 104 de SEQ ID NO: 2 (posición 138 en la figura 5) sustituido por un residuo de Ser, el residuo de Cys en la posición 129 de SEQ ID NO: 2 (posición 163 en la figura 5) sustituido por un residuo de Ser o Ala y/o el residuo de Cys en la posición 140 de SEQ ID NO: 2 (posición 174 en la figura 5) sustituido por un residuo de Ser o Ala.

Las variantes de polipéptido similar a IL-17 preferidas incluyen variantes de glicosilación en el que el número y/o tipo de sitio de glicosilación se han alterado en comparación con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10. En una realización, las variantes de polipéptido similar a IL-17 comprenden un número mayor o menor de sitios de glicosilación unidos a N que la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10. Un sitio de glicosilación unido a N se caracteriza por la secuencia: Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en la que el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto prolina. La sustitución de residuos de aminoácido para crear esta secuencia proporciona un posible nuevo sitio para la adición de una cadena de hidrato de carbono unida a N. Alternativamente, las sustituciones que eliminan esta secuencia eliminarán una cadena de hidrato de carbono unida a N existente. También se proporciona una redistribución de cadenas de hidrato de carbono unidas a N en la que se eliminan uno o más sitios de glicosilación unidos a N (normalmente los que se producen de manera natural) y se crean uno más sitios unidos a N nuevos. Las variantes de polipéptido similar a IL-17 preferidas adicionales incluyen variantes de cisteína en las que se delecionan uno o más residuos de cisteína de o se sustituyen por otro aminoácido (por ejemplo, serina) en comparación con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10. Las variantes de cisteína son útiles cuando deben volverse a plegar polipéptidos similares a IL-17 en una conformación biológicamente activa tal como tras el aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. Las variantes de cisteína generalmente tienen menos residuos cisteína que la proteína nativa, y normalmente tienen un número par para minimizar las interacciones que resultan de cisteínas desapareadas.

Además, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10, o una variante de polipéptido similar a IL-17 pueden fusionarse con un polipéptido homólogo para formar un homodímero o con un polipéptido heterólogo para formar un heterodímero. Los péptidos y polipéptidos heterólogos incluyen, pero no se limitan a: un epítipo que permite la detección y/o el aislamiento de un polipéptido de fusión de

polipéptido similar a IL-17; una proteína receptora transmembrana o una parte de la misma, tal como un dominio extracelular, o un dominio transmembrana e intracelular; un ligando o una parte del mismo que se une a una proteína receptora transmembrana; una enzima o una parte de la misma que es catalíticamente activa; un polipéptido o péptido que promueve la oligomerización, tal como un dominio de cremallera de leucinas; un polipéptido o péptido que aumenta la estabilidad, tal como una región constante de inmunoglobulina; y un polipéptido que tiene una actividad terapéutica diferente del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos tal como se expone en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10, o una variante de polipéptido similar a IL-17.

Pueden realizarse fusiones o bien en el extremo amino terminal o bien en el extremo carboxilo terminal del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10, o una variante de polipéptido similar a IL-17. Las fusiones pueden ser directas sin molécula de adaptador o ligador, o indirectas usando una molécula de adaptador o ligador. Una molécula de adaptador o ligador puede ser uno o más residuos de aminoácido, normalmente desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 50 residuos de aminoácido. Una molécula de adaptador o ligador también puede diseñarse con un sitio de escisión para una endonucleasa de restricción de ADN o para una proteasa para permitir la separación de los restos fusionados. Se apreciará que una vez construidos, los polipéptidos de fusión pueden derivatizarse según los métodos descritos en el presente documento.

En una descripción adicional, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una variante de polipéptido similar a IL-17 se fusiona con uno o más dominios de una región de Fc de IgG humana. Los anticuerpos comprenden dos partes funcionalmente independientes, un dominio variable conocido como "Fab", que se une a antígenos, y un dominio constante conocido como "Fc", que está implicado en funciones efectoras tales como activación del complemento y ataque por células fagocíticas. Un Fc tiene una semivida sérica larga, mientras que un Fab es de semivida corta. Capon *et al.*, Nature, 337:525-31 (1989). Cuando se construye junto con una proteína terapéutica, un dominio Fc puede proporcionar semivida más larga o incorporar funciones tales como unión a receptor de Fc, unión a proteína A, fijación del complemento y quizá incluso transferencia placentaria. *Id.*

La tabla II resume el uso de determinadas fusiones de Fc conocidas en la técnica.

Tabla II

Fusión de Fc con proteínas terapéuticas

Forma de Fc	Compañero de fusión	Implicaciones terapéuticas	Referencia
IgG1	extremo N-terminal de CD3-L	enfermedad de Hodgkin; linfoma anaplásico; leucemia de células T	Patente estadounidense n.º 5.480.981
Fc γ 2 murino	IL-10	antiinflamatoria; rechazo de trasplante	Zheng <i>et al.</i> (1995) J. Immunol., 154: 5590-5600
IgG1	receptor de TNF	choque septicémico	Fisher <i>et al.</i> (1996), N. Engl. J. Med., 334: 1697-1702; Van Zee <i>et al.</i> , (1996) J. Immunol., 156: 2221-2230
IgG, IgA, IgM o IgE (excluyendo el primero dominio)	receptor de TNF	inflamación, trastornos autoinmunitarios	Patente estadounidense n.º 5.808.029, expedida el 15 de septiembre de 1998
IgG1	receptor de CD4	SIDA	Capon <i>et al.</i> (1989), Nature 337: 525-531
IgG1, IgG3	extremo N-terminal de IL-2	anticancerígeno, antiviral	Harvill <i>et al.</i> (1995) Immunotech., 1: 95-105
IgG1	extremo C-terminal de OPG	osteoartritis; densidad ósea	Documento WO 97/23614, publicado el 3 de julio de 1997
IgG1	extremo-N terminal de leptina	antiobesidad	Documento PCT/US 97/23183, presentado el 11 de diciembre de 1997
C γ 1 de Ig humana	CTLA-4	trastornos autoinmunitarios	Linsley (1991), J. Exp. Med., 174:561-569

En un ejemplo, toda o una parte de las regiones de bisagra de IgG humana, CH₂ y CH₃ pueden fusionarse o bien en el extremo N-terminal o bien en el extremo C-terminal de los polipéptidos similares a IL-17 usando métodos conocidos por el experto en la técnica. El polipéptido de fusión similar a IL-17 resultante puede purificarse mediante el uso de una columna de afinidad a proteína A. Se ha encontrado que los péptidos y las proteínas fusionadas a una región Fc presentan una semivida sustancialmente mayor *in vivo* que las equivalente no fusionadas. Además, una fusión a una región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido de fusión. La región Fc puede ser una región Fc que se produce de manera natural, o puede alterarse para mejorar determinadas cualidades, tales como cualidades terapéuticas, tiempo de circulación, reducir la agregación, etc.

Puede calcularse fácilmente la identidad y la similitud de polipéptidos y moléculas de ácido nucleico relacionadas mediante métodos conocidos. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., ed., Humana Press, Nueva Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., ed., M. Stockton Press, Nueva York (1991); y Carillo *et al.*, SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988) .

Los métodos preferidos para determinar la identidad y/o similitud se diseñan para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias sometidas a prueba. Los métodos para determinar la identidad y similitud se describen en programas informáticos públicamente disponibles. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programa GCG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, Nucl. Acid. Res., 12:387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)). El programa BLASTX está públicamente disponible del Centro Nacional de Información Biotecnológica ("*National Center for Biotechnology Information*") (NCBI) y otras fuentes {BLAST Manual, Altschul *et al.* NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul *et al.*, citado anteriormente (1990)). También puede usarse el algoritmo de Smith Waterman bien conocido para determinar la identidad.

Determinados esquemas de alineación para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado la coincidencia de solo una región corta de las dos secuencias, y esta pequeña región alineada puede tener identidad de secuencia muy alta incluso aunque no haya una relación significativa entre las dos secuencias de longitud completa. Por consiguiente, en una realización preferida, el método de alineación seleccionado (programa GAP) dará como resultado una alineación que abarca al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido diana.

Por ejemplo, usando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), se alinean dos polipéptidos para los que va a determinarse el porcentaje de identidad de secuencia para la coincidencia óptima de sus aminoácidos respectivos (el "tramo apareado", tal como se determina mediante el algoritmo). Se usan una penalización por apertura de huecos (que se calcula como 3X la diagonal promedio; la "diagonal promedio" es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que está usándose; la "diagonal" es la puntuación o el número asignado a cada coincidencia de aminoácido perfecta por la matriz de comparación particular) y una penalización por extensión de huecos (que habitualmente es 1/10 veces la penalización por apertura de huecos), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62 junto con el algoritmo. El algoritmo también usa una matriz de comparación convencional (véase Dayhoff *et al.*, Atlas of Protein Sequence and Structure, 5(3) (1978) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89:10915-10919 (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62).

Los parámetros preferidos para una comparación de secuencias de polipéptidos incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman *et al.*, J. Mol. Biol., 48:443-453 (1970);

Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff *et al.*, citado anteriormente (1992);

Penalización por hueco: 12

Penalización por longitud de hueco: 4

Umbral de similitud: 0

El programa GAP es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para las comparaciones de polipéptidos (junto con sin penalización para los huecos de los extremos) usando el algoritmo GAP.

Los parámetros preferidos para las comparaciones de secuencias de moléculas de ácido nucleico incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman *et al.*, citado anteriormente (1970);

Matriz de comparación: coincidencias = +10, no coincidencia = 0

Penalización por hueco: 50

Penalización por longitud de hueco: 3

El programa GAP también es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de moléculas de ácido nucleico.

Pueden usarse otros algoritmos, penalizaciones por apertura de huecos, penalizaciones por extensión de huecos, matrices de comparación, umbrales de similitud, etc., a modo de ejemplo, incluyendo los expuestos en el manual del

programa, paquete Wisconsin, versión 9, septiembre de 1997. Las elecciones particulares que van a realizarse resultarán evidentes para los expertos en la técnica y dependerán de la comparación específica que va a realizarse, tal como ADN con ADN, proteína con proteína, proteína con ADN; y adicionalmente, si la comparación es entre pares dados de secuencias (en cuyo caso se prefieren generalmente GAP o BestFit) o entre una secuencia y una gran base de datos de secuencias (en cuyo caso se prefieren FASTA o BLASTA).

Síntesis

Los expertos en la técnica apreciarán que las moléculas de ácido nucleico y polipéptido descritas en el presente documento pueden producirse mediante medios recombinantes y otros.

Moléculas de ácido nucleico

Las moléculas de ácido nucleico codifican para un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de un polipéptido similar a IL-17 y pueden obtenerse fácilmente en una variedad de maneras incluyendo, sin limitación, síntesis química, ADNc o examen de biblioteca genómica, examen de biblioteca de expresión y/o amplificación mediante PCR de ADNc.

Los métodos de ADN recombinante usados en el presente documento son generalmente los expuestos en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), y/o Ausubel *et al.*, ed., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishers Inc. y Wiley and Sons, NY (1994). La presente solicitud da a conocer moléculas de ácido nucleico tal como se describen en el presente documento y métodos para obtener tales moléculas.

Cuando se ha identificado un gen que codifica para la secuencia de aminoácidos de un polipéptido similar a IL-17 de una especie, puede usarse todo o una parte de ese gen como sonda para identificar ortólogos o genes relacionados de la misma especie. Las sondas o cebadores pueden usarse para examinar bibliotecas de ADNc de diversas fuentes de tejido que se cree que expresan el polipéptido similar a IL-17. Además, parte o toda de una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia tal como se expone en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 9 puede usarse para examinar una biblioteca genómica para identificar y aislar un gen que codifica para la secuencia de aminoácidos de un polipéptido similar a IL-17. Normalmente, se emplearán condiciones de rigurosidad moderada o alta para examinar, para minimizar el número de falsos positivos obtenidos a partir del examen.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican para la secuencia de aminoácidos de polipéptidos similares a IL-17 también pueden identificarse mediante la clonación de expresión que emplea la detección de clones positivos basándose en una propiedad de la proteína expresada. Normalmente, se examinan bibliotecas de ácido nucleico mediante la unión de un anticuerpo u otro compañero de unión (por ejemplo, receptor o ligando) para proteínas clonadas que se expresan y presentan sobre la superficie de una célula huésped. El anticuerpo o compañero de unión se modifica con un marcador detectable para identificar las células que expresan el clon deseado.

Pueden seguirse técnicas de expresión recombinante realizadas según las descripciones expuestas a continuación para producir estos polinucleótidos y para expresar los polipéptidos codificados. Por ejemplo, insertando una secuencia de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de un polipéptido similar a IL-17 en un vector apropiado, un experto en la técnica puede producir fácilmente grandes cantidades de la secuencia de nucleótidos deseada. Entonces, las secuencias pueden usarse para generar sondas de detección o cebadores de amplificación. Alternativamente, puede insertarse un polinucleótido que codifica para la secuencia de aminoácidos de un polipéptido similar a IL-17 en un vector de expresión. Introduciendo el vector de expresión en un huésped apropiado, puede producirse el polipéptido similar a IL-17 codificado en grandes cantidades.

Otro método para obtener una secuencia de ácido nucleico adecuada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este método, se prepara ADNc a partir de poli(A)+ARN o ARN total usando la enzima transcriptasa inversa. Dos cebadores, normalmente complementarios para dos regiones separadas de ADNc (oligonucleótidos) que codifican para la secuencia de aminoácidos de un polipéptido similar a IL-17, se añaden entonces al ADNc junto con una polimerasa tal como Taq polimerasa, y la polimerasa amplifica la región de ADNc entre los dos cebadores.

Otros medios de preparación de una molécula de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de un polipéptido similar a IL-17 es síntesis química usando métodos bien conocidos por el experto en la técnica, tal como los descritos por Engels *et al.*, Angew. Chem. Intl. Ed., 28:716-734 (1989). Estos métodos incluyen, entre otros, los métodos de fosfotriéster, fosforamida y H-fosfonato para la síntesis de ácido nucleico. Un método preferido para tal síntesis química es síntesis soportada por polímero usando química de fosforamida convencional. Normalmente, el ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos de un polipéptido similar a IL-17 tendrá varios cientos de nucleótidos de longitud. Pueden sintetizarse ácidos nucleicos mayores de aproximadamente 100 nucleótidos como varios fragmentos usando estos métodos. Entonces, los fragmentos pueden ligarse entre sí formando la secuencia de nucleótidos de secuencia completa de un polipéptido similar a IL-17. Habitualmente, el fragmento de ADN que codifica para el extremo amino terminal del polipéptido tendrá un ATG, que codifica para un residuo de metionina. Esta metionina puede estar o no presente en la forma madura del polipéptido similar a IL-17, dependiendo de si el polipéptido producido en la célula huésped está diseñado para secretarse a partir de esa célula. También pueden usarse otros métodos conocidos por el experto en la técnica.

En determinadas realizaciones, las variantes de ácido nucleico contienen codones que se han alterado para la expresión óptima de un polipéptido similar a IL-17 en una célula huésped dada. Las alteraciones de codón particulares dependerán del/de los polipéptido(s) similar(es) a IL-17 y la/las célula(s) huésped seleccionada(s) para la expresión. Tal "optimización de codones" puede llevarse a cabo mediante una variedad de métodos, por ejemplo, seleccionando codones que se prefieren para su uso en genes altamente expresados en una célula huésped dada. Pueden usarse algoritmos informáticos que incorporan tablas de frecuencia de codones tales como "Ecohigh.cod" para determinar la preferencia de codones de genes bacterianos altamente expresados y se proporcionan por el University of Wisconsin Package versión 9.0, Genetics Computer Group, Madison, WI. Otras tablas de frecuencia de codones útiles incluyen "Celegans_high.cod", "Celegans_low.cod", "Drosophila_high.cod", "Human_high.cod", "Maize_high.cod" y "Yeast_high.cod".

Vectores y células huésped

Una molécula de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de un polipéptido similar a IL-17 puede insertarse en un vector de expresión apropiado usando técnicas de ligamiento habituales. El vector se selecciona normalmente para que sea funcional en la célula huésped particular empleada (es decir, el vector es compatible con la maquinaria de la célula huésped de modo que puede producirse la amplificación del gen y/o la expresión del gen). Una molécula de ácido nucleico que codifica para la secuencia de aminoácidos de un polipéptido similar a IL-17 puede amplificarse/expresarse en células huésped procariontas, de levadura, de insecto (sistemas de baculovirus) y/o eucariotas. La selección de la célula huésped dependerá en parte de si un polipéptido similar a IL-17 va a modificarse postraduccionalmente (por ejemplo, glicosilarse y/o fosforilarse). Si es así, son preferibles células huésped de levadura, de insecto o de mamífero. Para una revisión de vectores de expresión, véase Met. Enz., vol. 185, D.V. Goeddel, ed., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990).

Normalmente, los vectores de expresión usados en cualquiera de las células huésped contendrán secuencias para el mantenimiento del plásmido y para la clonación y la expresión de secuencias de nucleótidos exógenas. Tales secuencias, denominadas conjuntamente "secuencias flanqueantes" en determinadas realizaciones, incluirán normalmente una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de replicación, una secuencia de terminación transcripcional, una secuencia de intrón completa que contiene un sitio de corte y empalme donador y aceptor, una secuencia que codifica para una secuencia líder para la secreción del polipéptido, un sitio de unión a ribosomas, una secuencia de poliadenilación, una región de poliligador para insertar el ácido nucleico que codifica para el polipéptido que va a expresarse y un elemento de marcador seleccionable. Cada una de estas secuencias se comenta a continuación.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia que codifica para una "etiqueta", es decir, una molécula de oligonucleótido ubicada en el extremo 5' o 3' de la secuencia que codifica para polipéptido similar a IL-17; la secuencia de oligonucleótido codifica para poliHis (tal como hexaHis), u otra "etiqueta" tal como FLAG, HA (hemaglutinina de virus influenza) o myc para las que existen anticuerpos disponibles comercialmente. Esta etiqueta se fusiona normalmente con el polipéptido tras la expresión del polipéptido, y puede servir como medio para la purificación por afinidad del polipéptido similar a IL-17 de la célula huésped. La purificación por afinidad puede lograrse, por ejemplo, mediante cromatografía en columna usando anticuerpos contra la etiqueta como una matriz de afinidad. Opcionalmente, la etiqueta puede eliminarse posteriormente del polipéptido similar a IL-17 purificado mediante diversos medios tales como el uso de determinadas peptidasas para la escisión.

Las secuencias flanqueantes pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa que la célula huésped), heterólogas (es decir, de una especie distinta de la especie o cepa de la célula huésped), híbridas (es decir, una combinación de secuencias flanqueantes de más de una fuente) o sintéticas, o las secuencias flanqueantes pueden ser secuencias nativas que normalmente funcionan regulando la expresión de polipéptido similar a IL-17. Como tal, la fuente de una secuencia flanqueante puede ser cualquier organismo procarionta o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado o cualquier vegetal, siempre que la secuencia flanqueante sea funcional en, y pueda activarse por, la maquinaria de la célula huésped.

Las secuencias flanqueantes útiles en los vectores de esta invención pueden obtenerse mediante cualquiera de varios métodos bien conocidos en la técnica. Normalmente, las secuencias flanqueantes útiles en el presente documento distintas de las secuencias flanqueantes del gen de polipéptido similar a IL-17 se habrán identificado previamente mediante mapeo y/o mediante digestión con endonucleasas de restricción y por tanto pueden aislarse de la fuente de tejido apropiada usando las endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, puede conocerse la secuencia de nucleótidos completa de una secuencia flanqueante. En este caso, la secuencia flanqueante puede sintetizarse usando los métodos descritos en el presente documento para la síntesis o la clonación de ácido nucleico.

Cuando se conoce toda o solo una parte de la secuencia flanqueante, puede obtenerse usando PCR y/o mediante examen de una biblioteca genómica con fragmentos de secuencia flanqueante y/u oligonucleótido adecuados de la misma o de otra especie. Cuando no se conoce la secuencia flanqueante, puede aislarse un fragmento de ADN que contiene una secuencia flanqueante a partir de un trozo más grande de ADN que puede contener, por ejemplo, una secuencia codificante o incluso otro gen o genes. El aislamiento puede lograrse mediante digestión con endonucleasas de restricción para producir el fragmento de ADN apropiado seguido por aislamiento usando

purificación en gel de agarosa, cromatografía en columna Qiagen® (Chatsworth, CA), u otros métodos conocidos por el experto en la técnica. La selección de enzimas adecuadas para lograr este fin resultará fácilmente evidente para un experto habitual en la técnica.

5 Un origen de replicación es normalmente una parte de los vectores de expresión procariotas adquiridos comercialmente, y el origen ayuda en la amplificación del vector en una célula huésped. La amplificación del vector hasta un determinado número de copias puede ser importante, en algunos casos, para la expresión óptima de un polipéptido similar a IL-17. Si el vector de elección no contiene un origen de sitio de replicación, puede sintetizarse químicamente uno basándose en una secuencia conocida, y ligarse en el vector. Por ejemplo, el origen de replicación del plásmido pBR322 (n.º de producto 303-3s, New England Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas, y diversos orígenes (por ejemplo, SV40, polioma, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV) o virus del papiloma tales como VPH o VPB) son útiles para clonar vectores en células de mamífero. Generalmente, el componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero (por ejemplo, a menudo el origen de SV40 se usa sólo debido a que contiene el promotor temprano).

15 Una secuencia de terminación de la transcripción se ubica normalmente en 3' del extremo de una región que codifica para polipéptido y sirve para terminar la transcripción. Habitualmente, una secuencia de terminación de la transcripción en células procariotas es un fragmento rico en G-C seguido por una secuencia de poli T. Aunque la secuencia se clona fácilmente a partir de una biblioteca o incluso se adquiere comercialmente como parte de un vector, también puede sintetizarse fácilmente usando métodos para la síntesis de ácidos nucleicos tales como los descritos en el presente documento.

20 Un elemento de gen marcador seleccionable codifica para una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento de una célula huésped hecha crecer en un medio de cultivo selectivo. Los genes de marcador de selección típicos codifican para proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, tetraciclina o kanamicina para células huésped procariotas, (b) complementan deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos. Marcadores seleccionables preferidos son el gen de resistencia a kanamicina, el gen de resistencia a ampicilina y el gen de resistencia a tetraciclina. También puede usarse un gen de resistencia a neomicina para la selección en células huésped procariotas y eucariotas.

30 Pueden usarse otros genes de selección para amplificar el gen que va a expresarse. La amplificación es el proceso en el que los genes que se demandan más para la producción de una proteína crítica para el crecimiento se repiten en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina cinasa. Los transformantes de células de mamífero se colocan bajo presión de selección a la que sólo los transformantes están excepcionalmente adaptados para sobrevivir en virtud del gen de selección presente en el vector. La presión de selección se impone cultivando las células transformadas en condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio se cambia sucesivamente, conduciendo de ese modo a la amplificación tanto del gen de selección como del ADN que codifica para un polipéptido similar a IL-17. Como resultado, se sintetizan cantidades aumentadas de polipéptido similar a IL-17 a partir del ADN amplificado.

35 Habitualmente, es necesario un sitio de unión a ribosomas para la iniciación de la traducción de ARNm y se caracteriza por una secuencia de Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia de Kozak (eucariotas). El elemento se ubica normalmente en 3' con respecto al promotor y en 5' con respecto a la secuencia codificante de un polipéptido similar a IL-17 que va a expresarse. La secuencia de Shine-Dalgarno varía pero normalmente es una polipurina (es decir, que tiene un alto contenido en A-G). Se han identificado muchas secuencias de Shine-Dalgarno, cada una de la cuales puede sintetizarse fácilmente usando métodos expuestos en el presente documento y usarse en un vector procariota.

45 Una secuencia líder, o señal, puede usarse para dirigir un polipéptido similar a IL-17 fuera de la célula huésped. Normalmente, se sitúa una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia señal en la región codificante de una molécula de ácido nucleico de polipéptido similar a IL-17, o directamente en el extremo 5' de una región que codifica para polipéptido similar a IL-17. Se han identificado muchas secuencias señal, y puede usarse cualquiera de las que son funcionales en la célula huésped seleccionada conjuntamente con una molécula de ácido nucleico de polipéptido similar a IL-17. Por tanto, una secuencia señal puede ser homóloga (que se produce de manera natural) o heteróloga para un ADNc o gen de polipéptido similar a IL-17. Adicionalmente, una secuencia señal puede sintetizarse químicamente usando métodos descritos en el presente documento. En la mayoría de los casos, la secreción de un polipéptido similar a IL-17 a partir de la célula huésped por medio de la presencia de un péptido señal dará como resultado la eliminación del péptido señal del polipéptido similar a IL-17 secretado. La secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte de una molécula de ácido nucleico de polipéptido similar a IL-17 que se inserta en el vector.

60 Incluido dentro del alcance de esta descripción está el uso de o bien una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia señal de polipéptido similar a IL-17 nativa unida a una región que codifica para polipéptido similar a IL-17 o bien una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia señal heteróloga unida a una región que codifica para polipéptido similar a IL-17. La secuencia señal heteróloga seleccionada debe ser una que se reconozca

y se procese, es decir, se escinda por una peptidasa de señal, por la célula huésped. Para células huésped procariotas que no reconocen ni procesan la secuencia señal de polipéptido similar a IL-17 nativa, se sustituye la secuencia señal por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinasas o líderes de enterotoxina II termoestables. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal de polipéptido similar a IL-17 nativa puede sustituirse por los líderes de invertasa, factor alfa o fosfatasa ácida de levaduras. En la expresión de células de mamífero, la secuencia señal nativa es satisfactoria, aunque pueden ser adecuadas otras secuencias señal de mamíferos.

En algunos casos, tales como en los que se desea la glicosilación en un sistema de expresión de células huésped eucariotas, pueden manipularse las diversas secuencias previas para mejorar la glicosilación o el rendimiento. Por ejemplo, puede alterarse el sitio de escisión de peptidasas de un péptido señal particular, o añadirse secuencias previas, lo que también puede afectar a la glicosilación. El producto de proteína final puede tener, en la posición -1 (en relación con el primer aminoácido de la proteína madura), uno o más aminoácidos adicionales que inciden en la expresión que pueden no haberse eliminado totalmente. Por ejemplo, el producto de proteína final puede tener uno o dos residuos de aminoácido encontrados en el sitio de escisión de peptidasa, unidos al extremo N-terminal. Alternativamente, el uso de algunos sitios de escisión enzimáticos pueden dar como resultado una forma ligeramente truncada del polipéptido similar a IL-17 deseado, si la enzima corta en tal zona dentro del polipéptido maduro.

En muchos casos, la transcripción de una molécula de ácido nucleico aumenta por la presencia de uno o más intrones en el vector; esto es particularmente cierto cuando se produce un polipéptido en células huésped eucariotas, especialmente células huésped de mamífero. Los intrones usados pueden producirse de manera natural dentro del gen de polipéptido similar a IL-17, especialmente cuando el gen usado es una secuencia genómica de longitud completa o un fragmento de la misma. Cuando el intrón no se produce de manera natural dentro del gen (como para la mayoría de los ADNc), el/los intrón/intrones pueden obtenerse a partir de otra fuente. La posición del intrón con respecto a las secuencias flanqueantes y el gen de polipéptido similar a IL-17 generalmente es importante, ya que el intrón debe transcribirse para que sea eficaz. Por tanto, cuando está transcribiéndose una molécula ADNc de polipéptido similar a IL-17, la posición preferida para el intrón es en 3' con respecto al sitio de inicio de la transcripción y en 5' con respecto a la secuencia de terminación de la transcripción de poliA. Preferiblemente, el intrón o los intrones se ubicarán en un lado o en el otro (es decir, en 5' o 3') del ADNc de modo que no interrumpa la secuencia codificante. Cualquier intrón de cualquier fuente, incluyendo organismos virales, procariotas y eucariotas (vegetales o animales), puede usarse para poner en práctica esta invención, siempre que sea compatible con la/las célula(s) huésped en la/las que va a insertarse. También se incluyen en el presente documento intrones sintéticos. Opcionalmente, puede usarse más de un intrón en el vector.

Los vectores de expresión y clonación dados a conocer en el presente documento contendrán cada uno normalmente un promotor que se reconoce por el organismo huésped y se une operativamente a la molécula que codifica para un polipéptido similar a IL-17. Los promotores son secuencias no transcritas ubicadas en el sentido de 5' (5') del codón de iniciación de un gen estructural (generalmente dentro de aproximadamente de 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convencionalmente en una de dos clases, promotores inducibles y promotores constitutivos. Los promotores inducibles inician niveles aumentados de transcripción de ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tales como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura. Los promotores constitutivos, por otro lado, inician una producción de producto génico continua; es decir, hay poco o ningún control sobre la expresión génica. Se conoce bien un gran número de promotores, reconocidos por una variedad de posibles células huésped. Un promotor adecuado se une operativamente al ADN que codifica para un polipéptido similar a IL-17 eliminando el promotor del ADN fuente mediante digestión con enzimas de restricción e insertando la secuencia promotora deseada en el vector. La secuencia promotora del gen de polipéptido similar a IL-17 nativa puede usarse para dirigir la amplificación y/o la expresión de una molécula de ácido nucleico de polipéptido similar a IL-17. Sin embargo, se prefiere un promotor heterólogo, si permite mayor transcripción y rendimientos superiores de la proteína expresada en comparación con el promotor nativo, y si es compatible con el sistema de célula huésped que se ha seleccionado para su uso.

Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen los sistemas de promotor de beta-lactamasa y lactosa; fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (trp); y promotores híbridos tales como el promotor tac. También son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Sus secuencias se han publicado, permitiendo de ese modo a un experto en la técnica ligarlas con la/las secuencia(s) de ADN deseada(s), usando ligadores o adaptadores según sea necesario para suministrar cualquier sitio de restricción útil.

En la técnica también se conocen bien promotores adecuados para su uso con huéspedes de levadura. Ventajosamente, se usan potenciadores de levadura con promotores de levadura. Se conocen bien promotores adecuados para su uso con células huésped de mamífero e incluyen, pero no se limitan a, los obtenidos a partir de los genomas de virus tales como poliomavirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tales como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (CMV), un retrovirus, virus de la hepatitis B y lo más preferiblemente virus de simio 40 (SV40). Otros promotores de mamífero adecuados incluyen promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, promotores de choque térmico y el promotor de actina.

Los promotores adicionales que pueden ser de interés en el control de la transcripción del gen de polipéptido similar a IL-17 incluyen, pero no se limitan a: la región promotora temprana de SV40 (Bernoist y Chambon, *Nature*, 290:304-310, (1981)), el promotor de CMV, el promotor contenido en la repetición terminal larga en 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.*, *Cell*, 22:787-797, (1980)); el promotor de timidina cinasa de herpes (Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:144-145, (1981)), las secuencias reguladoras del gen de metalotionina (Brinster *et al.*, *Nature*, 296:39-42, (1982)), vectores de expresión procariotas tales como el promotor de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:3727-3731, (1978)) o el promotor tac (DeBoer, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25, (1983)). También son de interés las siguientes regiones de control de la transcripción animales, que presentan especificidad de tejido y se han utilizado en animales transgénicos: la región de control del gen de elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas [Swift *et al.*, *Cell*, 38:639-646, (1984); Ornitz *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 50:399-409, (1986); MacDonald, *Hepatology*, 7:425-515 (1987)]; la región de control del gen de insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, *Nature*, 315:115-122, (1985)); la región de control del gen de inmunoglobulina que activa en células linfoides (Grosschedl *et al.*, *Cell*, 38:647-658 (1984)); Adames *et al.*, *Nature*, 318:533-538, (1985)); (Alexander *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:1436-1444, (1987)); la región de control del virus de tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder *et al.*, *Cell*, 45:485-495, (1986)); la región de control del gen de albúmina que es activa en el hígado (Pinkert *et al.*, *Genes y Devel.*, 1:268-276, (1987)); la región de control del gen de alfafetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-1648, (1985)); Hammer *et al.*, *Science*, 235:53-58, (1987)); la región de control del gen de alfa 1-antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey *et al.*, *Genes y Devel.*, 1:161-171, (1987)); la región de control del gen de betaglobina que es activa en células mieloides [Mogram *et al.*, *Nature*, 315:338-340, (1985); Kollias *et al.*, *Cell*, 46:89-94, (1986)]; la región de control del gen de la proteína básica de la mielina que es activa en los oligodendrocitos en el cerebro (Readhead *et al.*, *Cell*, 48:703-712, (1987)); la región de control del gen de la cadena ligera 2 de miosina que es activa en el músculo esquelético (Sani, *Nature*, 314:283-286, (1985)); y la región de control del gen de hormona liberadora de gonadotropina que es activa en el hipotálamo (Mason *et al.*, *Science*, 234:1372-1378, (1986)).

Puede insertarse una secuencia potenciadora en el vector para aumentar la transcripción de un ADN que codifica para un polipéptido similar a IL-17 tal como se da a conocer en el presente documento por eucariotas superiores. Los potenciadores son elementos de DNA de actuación en cis, habitualmente de aproximadamente 10-300 pb de longitud, que actúan sobre el promotor para aumentar la transcripción. Los potenciadores son relativamente independientes de la orientación y la posición. Se han encontrado en 5' y 3' con respecto a la unidad de transcripción. Se conocen varias secuencias potenciadoras disponibles de genes de mamífero (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina, alfa-feto-proteína e insulina). Sin embargo, normalmente se usará un potenciador de un virus. El potenciador de SV40, el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma y potenciadores de adenovirus son elementos de potenciación a modo de ejemplo para la activación de promotores eucariotas. A pesar de que un potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición en 5' o 3' con respecto a una molécula de ácido nucleico de polipéptido similar a IL-17, normalmente se ubica en un sitio en 5' desde el promotor.

Los vectores de expresión dados a conocer en el presente documento pueden construirse a partir de un vector de inicio tal como un vector disponible comercialmente. Tales vectores pueden o no contener todas las secuencias flanqueantes deseadas. Cuando una o más de las secuencias flanqueantes deseadas no están ya presentes en el vector, pueden obtenerse individualmente y ligarse en el vector. El experto en la técnica conoce bien los métodos usados para obtener cada una de las secuencias flanqueantes.

Vectores preferidos para poner en práctica esta descripción son los que son compatibles con células huésped bacterianas, de insecto y de mamífero. Tales vectores incluyen, entre otros, pCRII, pCR3 y pDNA3.1 (Invitrogen Company, Carlsbad, CA), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, CA), pET15□ (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBaclII; Invitrogen), pDSR-alfa (publicación PCT n.º WO 90/14363) y pFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island, NY).

Los vectores adecuados adicionales incluyen, pero no se limitan a, cósmidos, plásmidos o virus modificados, pero se apreciará que el sistema de vectores debe ser compatible con la célula huésped seleccionada. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos tales como derivados de plásmido Bluescript[®] (un fagémido basado en ColEI de alto número de copias, Stratagene Cloning Systems Inc., La Jolla CA), plásmidos de clonación por PCR diseñados para clonar productos de PCR amplificados mediante Taq (por ejemplo, kit TOPO[™] TA Cloning[®], derivados de plásmido PCR2.1[®], Invitrogen, Carlsbad, CA), y vectores de mamífero, levadura o virus tales como un sistema de expresión de baculovirus (derivados de plásmido pBacPAK, Clontech, Palo Alto, CA).

Tras haberse construido el vector y haberse insertado una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido similar a IL-17, en el sitio apropiado del vector, puede insertarse el vector completado en una célula huésped adecuada para la amplificación y/o expresión del polipéptido. La transformación de un vector de expresión para un polipéptido similar a IL-17 en una célula huésped seleccionada puede lograrse mediante métodos bien conocidos tales como transfección, infección, cloruro de calcio, electroporación, microinyección, lipofección o el método DEAE-dextrano u otras técnicas conocidas. El método seleccionado será en parte una función del tipo de célula huésped que va a usarse. El experto en la técnica conoce bien estos métodos y otros métodos adecuados y se exponen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

Las células huésped pueden ser células huésped procariotas (tales como *E. coli*) o células huésped eucariotas (tales como células de levadura, de un insecto o de vertebrado). La célula huésped, cuando se cultiva en condiciones apropiadas, sintetiza un polipéptido similar a IL-17 que puede recogerse posteriormente del medio de cultivo (si la célula huésped lo secreta al medio) o directamente de la célula huésped que lo produce (si no se secreta). La selección de una célula huésped apropiada dependerá de diversos factores, tales como niveles de expresión deseados, modificaciones de polipéptidos que son deseables o necesarias para la actividad (tales como glicosilación o fosforilación) y facilidad de plegamiento para dar una molécula biológicamente activa.

En la técnica se conocen varias células huésped adecuadas y muchas están disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo (*"American Type Culture Collection"*) (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO) (n.º de la ATCC CCL61); células CHO DHFR (Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:4216-4220 (1980)); células 293 o 293T de riñón embrionario humano (HEK) (n.º de la ATCC CRL1573); o células 3T3 (n.º de la ATCC CCL92). En la técnica se conocen la selección de células huésped de mamífero adecuadas y métodos para transformación, cultivo, amplificación, examen, producción de producto y purificación. Otras líneas celulares de mamífero adecuadas son las líneas celulares COS-1 (n.º de la ATCC CRL1650) y COS-7 (n.º de la ATCC CRL1651) de mono, y la línea celular CV-1 (n.º de la ATCC CCL70). Las células huésped de mamífero adicionales a modo de ejemplo incluyen líneas celulares de primate y líneas celulares de roedor, incluyendo líneas celulares transformadas. Células diploides normales, cepas de células derivadas a partir de cultivo *in vitro* de tejido primario, así como explantes primarios, también son adecuadas. Las células candidatas pueden ser deficientes genotípicamente en el gen de selección, o pueden contener un gen de selección de actuación dominante. Otras líneas celulares de mamífero adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células N2A de neuroblastoma de ratón, HeLa, células L-929 de ratón, líneas 3T3 derivadas de ratones Swiss, Balb-c o NIH, líneas celulares de hámster BHK o HaK, que están disponibles de la ATCC. Cada una de estas líneas celulares las conocen y están disponibles para los expertos en la técnica de expresión de proteínas.

Células bacterianas son útiles de manera similar como células huésped adecuadas para la presente invención. Por ejemplo, las diversas cepas de *E. coli* (por ejemplo, HB101, (n.º de la ATCC 33694) DH5 α , DH10 y MC1061 (n.º de la ATCC 53338)) se conocen bien como células huésped en el campo de la biotecnología. En este método también pueden emplearse diversas cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, otros *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, y similares.

Muchas cepas de células de levadura conocidas por los expertos en la técnica también están disponibles como células huésped para la expresión de los polipéptidos de la presente invención. Las células de levadura preferidas incluyen, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

Adicionalmente, cuando se desee, pueden utilizarse sistemas de células de insectos en los métodos de la presente invención. Tales sistemas se describen por ejemplo en Kitts *et al.*, Biotechniques, 14:810-817 (1993); Lucklow, Curr. Opin. Biotechnol., 4:564-572 (1993); y Lucklow *et al.*, J. Virol., 67:4566-4579 (1993). Células de insecto preferidas son Sf-9 y Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

También pueden usarse animales transgénicos para expresar polipéptidos similares a IL-17 glicosilados. Por ejemplo, puede usarse un animal que produce leche transgénico (una vaca o cabra, por ejemplo) y obtener el presente polipéptido glicosilado en la leche del animal. También pueden usarse vegetales para producir polipéptidos similares a IL-17; sin embargo, en general, la glicosilación que se produce en vegetales es diferente de la que se produce en células de mamífero, y puede dar como resultado un producto glicosilado que no es adecuado para su uso terapéutico en seres humanos.

Producción de polipéptidos

Pueden cultivarse células huésped que comprenden un vector de expresión de polipéptido similar a IL-17 usando medios convencionales bien conocidos por el experto en la técnica. Los medios contendrán habitualmente todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y la supervivencia de las células. Los medios adecuados para cultivar células de *E. coli* incluyen, por ejemplo, caldo Luria (LB) y/o caldo Terrific (TB). Los medios adecuados para cultivar células eucariotas incluyen medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640), medio esencial mínimo (MEM) y/o medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), todos los cuales pueden complementarse con suero y/o factores de crecimiento tal como se indique por la línea celular particular que está cultivándose. Un medio adecuado para cultivos de insecto es el medio de Grace complementado con Yeastolate, hidrolizado de lactoalbúmina y/o suero de ternero fetal, según sea necesario.

Normalmente, se añade un antibiótico u otro compuesto útil para el crecimiento selectivo de células transformadas como complemento a los medios. El compuesto que va a usarse estará dictado por el elemento marcador seleccionable presente en el plásmido con el que se transformó la célula huésped. Por ejemplo, cuando el elemento marcador seleccionable es resistencia a kanamicina, el compuesto añadido al medio de cultivo será kanamicina. Otros compuestos para el crecimiento selectivo incluyen ampicilina, tetraciclina y neomicina.

La cantidad de un polipéptido similar a IL-17 producida por una célula huésped puede evaluarse usando métodos

convencionales conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, sin limitación, análisis de inmunotransferencia de tipo Western, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, electroforesis en gel no desnaturizante, separación mediante HPLC, inmunoprecipitación y/o ensayos de actividad tales como ensayos de desplazamiento en gel de unión a ADN.

- 5 Si se ha diseñado un polipéptido similar a IL-17 para que se secreta a partir de las células huésped, la mayoría del polipéptido puede encontrarse en el medio de cultivo celular. Sin embargo, si el polipéptido similar a IL-17 no se secreta a partir de las células huésped, estará presente en el citoplasma y/o el núcleo (para células huésped eucariotas) o en el citosol (para células huésped bacterianas).

- 10 Para un polipéptido similar a IL-17 situado en el citoplasma y/o el núcleo de la célula huésped (para células huésped eucariotas) o en el citosol (para células huésped bacterianas), puede extraerse el material intracelular (incluyendo cuerpos de inclusión para bacterias Gram-negativas) de la célula huésped usando cualquier técnica convencional conocida por el experto en la técnica. Por ejemplo, las células huésped pueden lisarse para liberar el contenido del periplasma/citoplasma mediante prensa francesa, homogeneización y/o sonicación seguido por centrifugación.

- 15 Si un polipéptido similar a IL-17 ha formado cuerpos de inclusión en el citosol, los cuerpos de inclusión a menudo pueden unirse a las membranas celulares interna y/o externa y por tanto se encontrarán principalmente en el material precipitado tras la centrifugación. Entonces, el material precipitado puede tratarse a pH extremos o con un agente caotrópico tal como un detergente, guanidina, derivados de guanidina, urea o derivados de urea en presencia de un agente reductor tal como ditiotreitól a pH alcalino o triscarboxietilfosfina a pH ácido para liberar, separar y solubilizar los cuerpos de inclusión. El polipéptido similar a IL-17 ahora en su forma soluble puede analizarse
20 entonces usando electroforesis en gel, inmunoprecipitación o similares. Si se desea aislar el polipéptido similar a IL-17, el aislamiento puede lograrse usando métodos convencionales tales como los descritos en el presente documento y en Marston *et al.*, *Met. Enz.*, 182:264-275 (1990).

- 25 En algunos casos, un polipéptido similar a IL-17 puede no ser biológicamente activo tras su aislamiento. Pueden usarse diversos métodos para "replegar" o convertir el polipéptido en su estructura terciaria y generar enlaces disulfuro para restaurar la actividad biológica. Tales métodos incluyen exponer el polipéptido solubilizado a un pH habitualmente por encima de 7 y en presencia de una concentración particular de un caotropo. La selección del caotropo es muy similar a las elecciones usadas para la solubilización del cuerpo de inclusión, pero habitualmente el caotropo se usa a una concentración inferior y no es necesariamente el mismo que los caotropos usados para la solubilización. En la mayoría de los casos la disolución de replegamiento/oxidación también contendrán un agente reductor o el agente reductor más su forma oxidada en una razón específica para generar un potencial redox particular que permita que se produzca la transposición de disulfuros en la formación del/de los puente(s) de cisteína de la proteína. Algunas de las parejas redox usadas comúnmente incluyen cisteína/cistamina, glutatión (GSH)/ditiobis-GSH, cloruro cúprico, ditiotreitól (DTT)/ditiolano-DTT y 2-2-mercaptoetanol (bME)/ditio-b(ME). Puede usarse un codisolvente para aumentar la eficacia del replegamiento, y los reactivos más comunes usados para este fin incluyen glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, arginina y similares.
35

Si no se forman cuerpos de inclusión en un grado significativo tras la expresión de un polipéptido similar a IL-17, entonces el polipéptido se encontrará principalmente en el sobrenadante tras la centrifugación del homogeneizado celular. El polipéptido puede aislarse adicionalmente a partir del sobrenadante usando métodos tales como los descritos en el presente documento.

- 40 La purificación de un polipéptido similar a IL-17 a partir de la disolución puede lograrse usando una variedad de técnicas. Si el polipéptido se ha sintetizado de manera que contiene una etiqueta tal como hexahistidina (polipéptido similar a IL-17/hexaHis) u otro péptido similar tal como FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) o myc (Invitrogen, Carlsbad, CA) en su extremo o bien carboxilo o bien amino terminal, puede purificarse en un procedimiento de una etapa haciendo pasar la disolución a través una columna de afinidad en la que la matriz de la columna tiene una gran afinidad por la etiqueta.
45

Por ejemplo, la polihistidina se une con gran afinidad y especificidad a níquel; por tanto puede usarse una columna de afinidad de níquel (tal como las columnas de níquel de Qiagen®) para la purificación de polipéptido similar a IL-17/poliHis. Véase por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, sección 10.11.8, John Wiley & Sons, Nueva York (1993).

- 50 Adicionalmente, el polipéptido similar a IL-17 puede purificarse mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que puede reconocer específicamente y unirse al polipéptido similar a IL-17.

- Por tanto, los procedimientos adecuados para la purificación incluyen, sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmutioafinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de tamiz molecular, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), electroforesis (incluyendo electroforesis en gel nativa) seguida por elución del gel e isoelectroenfoco preparativo (máquina/técnica "Isoprime", Hoefer Scientific, San Francisco, CA). En algunos casos, pueden combinarse dos o más técnicas de purificación para lograr un aumento de la pureza.
55

También pueden prepararse polipéptidos similares a IL-17 mediante métodos de síntesis química (tal como síntesis peptídica en fase sólida) usando técnicas conocidas en la técnica, tal como las expuestas por Merrifield *et al.*, *J. Am.*

Chem. Soc, 85:2149 (1963), Houghten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5132 (1985), y Stewart y Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984). Tales polipéptidos pueden sintetizarse con o sin una metionina en el extremo amino terminal. Los polipéptidos similares a IL-17 sintetizados químicamente pueden oxidarse usando métodos expuestos en estas referencias para formar puentes disulfuro. Se espera que los polipéptidos similares a IL-17 sintetizados químicamente tengan actividad biológica comparable a los polipéptidos similares a IL-17 correspondientes producidos de manera recombinante o purificados a partir de fuentes naturales, y por tanto puedan usarse de manera intercambiable con un polipéptido similar a IL-17 recombinante o natural.

Otros medios de obtención de un polipéptido similar a IL-17 son mediante purificación a partir de muestras biológicas tales como tejidos y/o fluidos de la fuente en los que el polipéptido similar a IL-17 se encuentra de manera natural. Tal purificación puede realizarse usando métodos para la purificación proteica tal como se describe en el presente documento. La presencia del polipéptido similar a IL-17 durante la purificación puede monitorizarse, por ejemplo, usando un anticuerpo preparado contra el polipéptido similar a IL-17 producido de manera recombinante o fragmentos peptídicos del mismo.

En la técnica se conocen varios métodos adicionales para producir ácidos nucleicos y polipéptidos, y los métodos pueden usarse para producir polipéptidos que tienen especificidad para polipéptido similar a IL-17. Véase por ejemplo, Roberts *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:12297-12303 (1997), que describen la producción de proteínas de fusión entre un ARNm y su péptido codificado. Véase también Roberts, R., Curr. Opin. Chem. Biol., 3:268-273 (1999). Adicionalmente, la patente estadounidense n.º 5.824.469 describe métodos de obtención de oligonucleótidos que pueden llevar a cabo una función biológica específica. El procedimiento implica generar un conjunto heterogéneo de oligonucleótidos, teniendo cada uno una secuencia aleatorizada en 5', una secuencia preseleccionada central y una secuencia aleatorizada en 3'. El conjunto heterogéneo resultante se introduce en una población de células que no presentan la función biológica deseada. Entonces se examinan las subpoblaciones de las células para determinar las que presentan una función biológica predeterminada. A partir de esa subpoblación, se aíslan oligonucleótidos que pueden llevar a cabo la función biológica deseada.

Las patentes estadounidenses n.ºs 5.763.192, 5.814.476, 5.723.323 y 5.817.483 describen procedimientos para producir péptidos o polipéptidos. Esto se realiza produciendo genes estocásticos o fragmentos de los mismos, e introduciendo entonces estos genes en células huésped que producen una o más proteínas codificadas por los genes estocásticos. Entonces se examinan las células huésped para identificar los clones que producen péptidos o polipéptidos que tienen la actividad deseada.

Otro método para producir péptidos o polipéptidos se describe en el documento PCT/US98/20094 (WO99/15650) presentado por Athersys, Inc. Conocido como "activación al azar de la expresión génica para el descubrimiento de genes" ("*Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery*") (RAGE-GD), el procedimiento implica la activación de la expresión o sobreexpresión génica endógena de un gen mediante métodos de recombinación *in situ*. Por ejemplo, la expresión de un gen endógeno se activa o aumenta integrando una secuencia reguladora en la célula diana que puede activar la expresión del gen mediante recombinación no homóloga o ilegítima. En primer lugar el ADN diana se somete a radiación y se inserta un promotor genético. El promotor finalmente localiza una rotura al principio de un gen, iniciando la transcripción del gen. Esto da como resultado la expresión del péptido o polipéptido deseado.

Se apreciará que estos métodos también pueden usarse para crear bibliotecas de expresión de proteínas similares a IL-17 exhaustivas, que pueden usarse posteriormente para el examen fenotípico de alto rendimiento en una variedad de ensayos, tales como ensayos bioquímicos, ensayos celulares y ensayos de organismo completo (por ejemplo, vegetal, ratón, etc.).

Derivados químicos

El experto en la técnica puede preparar derivados químicamente modificados de los polipéptidos similares a IL-17, según las descripciones expuestas a continuación en el presente documento. Los derivados de polipéptido similar a IL-17 se modifican de una manera que es diferente o bien en el tipo o bien en la ubicación de las moléculas unidas de manera natural al polipéptido. Los derivados pueden incluir moléculas formadas mediante la delección de uno o más grupos químicos unidos de manera natural. El polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10, o una variante de polipéptido similar a IL-17, puede modificarse mediante la unión covalente de uno o más polímeros. Por ejemplo, el polímero seleccionado es normalmente soluble en agua de modo que la proteína a la que se une no precipita en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. Se incluye dentro del alcance de polímeros adecuados una mezcla de polímeros. Preferiblemente, para uso terapéutico de la preparación de producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable.

Cada uno de los polímeros puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. Cada uno de los polímeros tiene normalmente un peso molecular promedio de entre aproximadamente de 2 kDa y aproximadamente 100 kDa (indicando el término "aproximadamente" que en preparaciones de un polímero soluble en agua, algunas moléculas pesarán más, algunas menos, que el peso molecular establecido). El peso molecular promedio de cada polímero es preferiblemente de entre aproximadamente 5 kDa, aproximadamente 50 kDa, más preferiblemente de entre aproximadamente 12 kDa y aproximadamente 40 kDa y lo más preferiblemente de entre

aproximadamente de 20 kDa y aproximadamente 35 kDa.

Los polímeros solubles en agua adecuados o mezclas de los mismos incluyen, pero no se limitan a, hidratos de carbono unidos a N o a O; azúcares; fosfatos; polietilenglicol (PEG) (incluyendo las formas de PEG que se han usado para derivatizar proteínas, incluyendo mono-alcoxi o ariloxi (C₁-C₁₀)-polietilenglicol); monometoxi-polietilenglicol; dextrano (tal como dextrano de bajo peso molecular de, por ejemplo, aproximadamente 6 kDa); celulosa; u otros polímeros a base de hidratos de carbono, poli-(N-vinilpirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol) y poli(alcohol vinílico). La presente invención también abarca moléculas de reticulación bifuncionales que pueden usarse para preparar multímeros unidos de manera covalente del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una variante de polipéptido similar a IL-17.

En general, la derivatización química puede realizarse en cualquier condición adecuada usada para hacer reaccionar una proteína con una molécula de polímero activada. Los métodos para preparar derivados químicos de polipéptidos comprenderán generalmente las etapas de (a) hacer reaccionar el polipéptido con la molécula de polímero activada (tal como un derivado de aldehído o éster reactivo de la molécula de polímero) en condiciones mediante las cuales el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 10, o una variante de polipéptido similar a IL-17 se une a una o más moléculas de polímero, y (b) obtener el/los producto(s) de reacción. Las condiciones de reacción óptimas se determinarán basándose en parámetros conocidos y el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor es la razón de moléculas de polímero:proteína, mayor es el porcentaje de molécula de polímero unida. En una realización, el derivado de polipéptido similar a IL-17 puede tener un resto de molécula de polímero individual en el extremo amino terminal (véase por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.234.784).

La pegilación del polipéptido puede llevarse a cabo específicamente mediante cualquiera de las reacciones de pegilación conocidas en la técnica, tal como se describe por ejemplo en las siguientes referencias: Francis *et al.*, Focus on Growth Factors, 3:4-10 (1992); documentos EP 0154316; EP 0401384 y patente estadounidense n.º 4.179.337. Por ejemplo, la pegilación puede llevarse a cabo por medio de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo) tal como se describe en el presente documento. Para las reacciones de acilación, el/los polímero(s) seleccionado(s) debe(n) tener un único grupo éster reactivo. Para la alquilación reductora, el/los polímero(s) seleccionado(s) debe(n) tener un único grupo aldehído reactivo. Un aldehído reactivo es, por ejemplo, propionaldehído de polietilenglicol, que es estable en agua, o derivados de mono-alcoxi o ariloxi (C₁-C₁₀) de los mismos (véase la patente estadounidense n.º 5.252.714).

En otra realización, los polipéptidos similares a IL-17 pueden acoplarse químicamente a biotina, y entonces se permite que las moléculas de biotina/polipéptido similar a IL-17 que se conjugan se unan a avidina, dando como resultado moléculas de avidina/biotina/polipéptido similar a IL-17 tetraivalentes. Los polipéptidos similares a IL-17 también pueden acoplarse covalentemente a dinitrofenol (DNP) o trinitrofenol (TNP) y precipitarse los conjugados resultantes con IgM anti-DNP o anti-TNP para formar conjugados decaméricos con una valencia de 10.

Generalmente, los estados que pueden aliviarse o modularse mediante la administración de los presentes derivados de polipéptido similar a IL-17 incluyen los descritos en el presente documento para polipéptidos similares a IL-17. Sin embargo, los derivados de polipéptido similar a IL-17 dados a conocer en el presente documento pueden tener actividades adicionales, actividad biológica potenciada o reducida, u otras características, tales como semivida aumentada o disminuida, en comparación con las moléculas no derivatizadas.

Animales no humanos modificados por ingeniería genética

Adicionalmente, dentro del alcance de la presente descripción se incluyen animales no humanos tales como ratones, ratas u otros roedores, conejos, cabras u ovejas, u otros animales de granja, en los que el gen (o genes) que codifica(n) para el polipéptido similar a IL-17 nativo se ha (se han) alterado ("desactivado") de manera que el nivel de expresión de este gen o genes disminuye significativamente o se suprime completamente. Tales animales pueden prepararse usando técnicas y métodos tales como los descritos en la patente estadounidense n.º 5.557.032.

La presente descripción incluye además animales no humanos tales como ratones, ratas u otros roedores, conejos, cabras, ovejas u otros animales de granja, en los que o bien la forma nativa del/de los gen(es) de polipéptido similar a IL-17 para ese animal o bien un/unos gen(es) de polipéptido similar a IL-17 heterólogo(s) se sobreexpresa(n) por el animal, creando así un animal "transgénico". Tales animales transgénicos pueden prepararse usando métodos bien conocidos tales como los descritos en la patente estadounidense n.º 5.489.743 y la solicitud PCT n.º WO 94/28122.

La presente descripción incluye además animales no humanos en los que el promotor para uno o más de los polipéptidos similares a IL-17 de la presente descripción está o bien activado o bien inactivado (por ejemplo, usando métodos de recombinación homóloga) para alterar el nivel de expresión de uno o más de los polipéptidos similares a IL-17 nativos.

Estos animales no humanos pueden usarse para la selección de candidatos farmacológicos. En tal selección, puede medirse el impacto de un candidato farmacológico sobre el animal; por ejemplo, los candidatos farmacológicos

pueden disminuir o aumentar la expresión del gen de polipéptido similar a IL-17. En determinadas realizaciones, la cantidad de polipéptido similar a IL-17 que se introduce puede medirse tras la exposición del animal al candidato farmacológico. Adicionalmente, en determinadas realizaciones, puede detectarse el impacto real del candidato farmacológico sobre el animal. Por ejemplo, la sobreexpresión de un gen particular puede dar como resultado, o estar asociado con, una enfermedad o un estado patológico. En tales casos, puede someterse a prueba la capacidad de un candidato farmacológico para disminuir la expresión del gen o su capacidad para prevenir o inhibir un estado patológico. En otros ejemplos, la producción de un producto metabólico particular tal como un fragmento de un polipéptido puede dar como resultado, o estar asociado con, una enfermedad o un estado patológico. En tales casos, puede someterse a prueba la capacidad de un candidato farmacológico para disminuir la producción de un producto metabólico de este tipo o su capacidad para prevenir o inhibir un estado patológico.

Microalineamiento

Se apreciará que puede utilizarse la tecnología de microalineamiento de ADN según la presente descripción. Los microalineamientos de ADN son alineamientos de alta densidad, en miniatura de ácidos nucleicos colocados sobre un soporte sólido, tal como vidrio. Cada célula o elemento dentro del alineamiento tiene numerosas copias de una única especie de ADN que actúa como diana para la hibridación para su ARNm relacionado. En la obtención del perfil de expresión usando tecnología de microalineamientos de ADN, en primer lugar se extrae ARNm de una célula o muestra de tejido y entonces se convierte enzimáticamente en ADNc marcado fluorescentemente. Este material se hibrida con el microalineamiento y se elimina el ADNc no unido mediante lavado. La expresión de genes diferenciados representados en el alineamiento se visualiza entonces cuantificando la cantidad de ADNc marcado que se une específicamente a cada ADN diana. De esta manera, puede cuantificarse la expresión de miles de genes con un alto rendimiento, de manera paralela a partir de una única muestra de material biológico.

Esta obtención del perfil de expresión de alto rendimiento tiene una amplia gama de aplicaciones con respecto a las moléculas de polipéptido similar a IL-17 de la invención, incluyendo pero sin limitarse a: la identificación y validación de genes relacionados con enfermedad de polipéptido similar a IL-17 como dianas para productos terapéuticos; toxicología molecular de moléculas de polipéptido similar a IL-17 e inhibidores de las mismas; estratificación de poblaciones y generación de marcadores sustitutos para ensayos clínicos; y la potenciación del descubrimiento de fármacos de molécula pequeña relacionados con polipéptido similar a IL-17 ayudando en la identificación de compuestos selectivos en exámenes de alto rendimiento (HTS).

Agentes de unión selectiva

Tal como se usa en el presente documento, el término "agente de unión selectiva" se refiere a una molécula que tiene especificidad para uno o más polipéptidos similares a IL-17. Los agentes de unión selectiva adecuados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y derivados de los mismos, polipéptidos y moléculas pequeñas. Pueden prepararse agentes de unión selectiva adecuados usando métodos conocidos en la técnica. Un agente de unión selectiva a polipéptido similar a IL-17 a modo de ejemplo de la presente invención puede unirse a una determinada parte del polipéptido similar a IL-17 inhibiendo de ese modo la unión del polipéptido al/a los receptor(es) de polipéptido similar a IL-17.

Agentes de unión selectiva tales como anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que se unen a polipéptidos similares a IL-17 están dentro del alcance de la presente descripción. Los anticuerpos pueden ser policlonales incluyendo policlonales mono-específicos, monoclonales (AcM), recombinantes, quiméricos, humanizados tales como injertados con CDR, humanos, de cadena sencilla y/o biespecíficos, así como fragmentos, variantes o derivados de los mismos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen las partes del anticuerpo que se unen a un epítipo en el polipéptido similar a IL-17. Los ejemplos de tales fragmentos incluyen fragmentos Fab y F(ab') generados mediante escisión enzimática de anticuerpos de longitud completa. Otros fragmentos de unión incluyen los generados mediante técnicas de DNA recombinante, tales como la expresión de plásmidos recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican para regiones variables de anticuerpo.

Se producen generalmente anticuerpos policlonales dirigidos hacia un polipéptido similar a IL-17 en animales (por ejemplo, conejos o ratones) mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales de polipéptido similar a IL-17 y un adyuvante. Puede ser útil conjugar un polipéptido similar a IL-17 con una proteína portadora que es inmunogénica en la especie que va a inmunizarse, tal como hemocianina de lapa californiana, suero, albúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja. Además, se usan agentes de agregación tales como alumbre para potenciar la respuesta inmunitaria. Tras la inmunización, se extrae sangre de los animales y se somete a ensayo el suero para determinar el título de anticuerpos anti-polipéptido similar a IL-17.

Se producen anticuerpos monoclonales dirigidos hacia un polipéptido similar a IL-17 usando cualquier método que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Los ejemplos de métodos adecuados para preparar anticuerpos monoclonales incluyen los métodos de hibridoma de Kohler *et al.*, Nature, 256:495-497 (1975) y el método de hibridoma de células B humanas, Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984) y Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987). La invención también proporciona líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales reactivos con polipéptidos similares a IL-17.

Los anticuerpos monoclonales dados a conocer en el presente documento pueden modificarse para su uso como productos terapéuticos. Una realización es un anticuerpo "quimérico" en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es/son idéntica(s) a u homóloga(s) a una secuencia correspondiente en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo. También se incluyen fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Véase la patente estadounidense n.º 4.816.567 y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1985).

En otra realización, un anticuerpo monoclonal de la invención es un anticuerpo "humanizado". En la técnica se conocen bien métodos para humanizar anticuerpos no humanos (véanse las patentes estadounidense n.ºs 5.585.089 y 5.693.762). Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. La humanización puede realizarse, por ejemplo, usando métodos descritos en la técnica (Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo al menos una parte de una región determinante de complementariedad (CDR) de roedor por las regiones correspondientes de un anticuerpo humano.

La presente descripción también abarca anticuerpos humanos que se unen a polipéptidos similares a IL-17. Usando animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena, tales anticuerpos se producen mediante inmunización con un antígeno de polipéptido similar a IL-17 (es decir, que tiene al menos 6 aminoácidos contiguos), conjugado opcionalmente con un portador. Véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551-2555 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362:255-258 (1993) y Bruggemann *et al.*, Year in Immunol., 7:33 (1993). En un método, tales animales transgénicos se producen incapacitando los loci endógenos que codifican para las cadenas de inmunoglobulina pesadas y ligeras en los mismos, e insertando loci que codifican para proteínas de cadena pesada y ligera humanas en el genoma de los mismos. Entonces, los animales parcialmente modificados, que son los que tienen menos que el complemento completo de modificaciones, se cruzan para obtener un animal que tiene todas las modificaciones del sistema inmunitario deseadas. Cuando se administra un inmunógeno, estos animales transgénicos producen anticuerpos con secuencias de aminoácidos humanas (en vez de, por ejemplo, murinas), incluyendo regiones variables que son inmunospecíficas para estos antígenos. Véanse las solicitudes PCT n.ºs PCT/US96/05928 y PCT/US93/06926. Se describen métodos adicionales en la patente estadounidense n.º 5.545.807, las solicitudes PCT n.ºs PCT/US91/245, PCT/GB89/01207 y en los documentos EP 546073B1 y EP 546073A1. También pueden producirse anticuerpos humanos mediante la expresión de ADN recombinante en células huésped o mediante la expresión en células de hibridoma tal como se describe en el presente documento.

En una realización alternativa, pueden producirse anticuerpos humanos a partir de bibliotecas de presentación en fago (Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227:381 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Estos procedimientos imitan la selección inmunitaria a través de la presentación de repertorios de anticuerpo sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos, y la selección posterior de fago mediante su unión a un antígeno de elección. Una de tales técnicas se describe en la solicitud PCT n.º PCT/US98/17364, que describe el aislamiento de anticuerpos agonistas de alta afinidad y funcionales para receptores de MPL y msk usando un enfoque de este tipo.

Se producen normalmente anticuerpos quiméricos, injertados con CDR y humanizados mediante métodos recombinantes. Los ácidos nucleicos que codifican para los anticuerpos se introducen en células huésped y se expresan usando materiales y procedimientos descritos en el presente documento. En una realización preferida, los anticuerpos se producen en células huésped de mamífero, tales como células CHO. Pueden producirse anticuerpos monoclonales (por ejemplo, humanos) mediante la expresión de ADN recombinante en células huésped o mediante la expresión en células de hibridoma tal como se describe en el presente documento.

Los anticuerpos anti-polipéptido similar a IL-17 de la descripción pueden emplearse en cualquier método de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación (Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, págs. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)) para la detección y cuantificación de polipéptidos similares a IL-17. Los anticuerpos se unirán a polipéptidos similares a IL-17 con una afinidad que es apropiada para el método de ensayo que está empleándose.

Para aplicaciones de diagnóstico, en determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-polipéptido similar a IL-17 pueden marcarse con un resto detectable. El resto detectable puede ser uno cualquiera que pueda producir, o bien directa o bien indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I ; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o peroxidasa del rábano (Bayer *et al.*, Met. Enz., 184:138-163 (1990)).

Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un patrón marcado (por ejemplo, un polipéptido similar a IL-17 o una parte inmunológicamente reactiva del mismo) para competir con el analito de muestra de prueba (un polipéptido similar a IL-17) por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo anti-polipéptido similar a IL-17. La cantidad de un polipéptido similar a IL-17 en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une,

normalmente se insolubilizan los anticuerpos antes o después de la competición, de manera que el patrón y el analito que están unidos a los anticuerpos pueden separarse convenientemente del patrón y del analito que permanecen sin unirse.

5 Normalmente, los ensayos de tipo sándwich implican el uso de dos anticuerpos, pudiendo unirse cada uno a una parte inmunogénica diferente, o epítipo, de la proteína que va a detectarse y/o cuantificarse. En un ensayo de tipo sándwich, al analito de muestra de prueba se une normalmente un primer anticuerpo que está inmovilizado sobre un soporte sólido, y después de eso se une un segundo anticuerpo al analito, formando así un complejo de tres partes insoluble. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar marcado por sí mismo con un resto detectable (ensayos de tipo sándwich directos) o puede medirse usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con un resto detectable (ensayos de tipo sándwich indirectos). Por ejemplo, un tipo de ensayo de tipo sándwich es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), en cuyo caso el resto detectable es una enzima.

10 Los agentes de unión selectiva, incluyendo anticuerpos anti-polipéptido similar a IL-17, también son útiles para la obtención de imágenes *in vivo*. Un anticuerpo marcado con un resto detectable puede administrarse a un animal, preferiblemente en el torrente sanguíneo, y se somete a ensayo la presencia y la ubicación del anticuerpo marcado en el huésped. El anticuerpo puede marcarse con cualquier resto que pueda detectarse en un animal, ya sea mediante resonancia magnética nuclear, radiología u otro medio de detección conocido en la técnica.

15 Los agentes de unión selectiva dados a conocer en el presente documento, incluyendo anticuerpos, pueden usarse como productos terapéuticos. Estos agentes terapéuticos son generalmente agonistas o antagonistas porque o bien potencian o bien reducen, respectivamente, al menos una de las actividades biológicas de un polipéptido similar a IL-17, incluyendo la actividad proinflamatoria de polipéptido similar a IL-17. En una realización, anticuerpos antagonistas usados según la invención son anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos que pueden unirse específicamente a un polipéptido similar a IL-17 y que pueden inhibir o eliminar la actividad funcional de un polipéptido similar a IL-17 *in vivo* o *in vitro*. En realizaciones preferidas, el agente de unión selectiva, por ejemplo, un anticuerpo antagonista, inhibirá la actividad funcional de un polipéptido similar a IL-17 en al menos aproximadamente el 50%, y preferiblemente en al menos aproximadamente el 80%. En otra descripción, el agente de unión selectiva puede ser un anticuerpo que puede interactuar con un compañero de unión de polipéptido similar a IL-17 (un ligando o receptor) inhibiendo o eliminando de ese modo la actividad de un polipéptido similar a IL-17 *in vitro* o *in vivo*. Se identifican mediante ensayos de selección bien conocidos en la técnica agentes de unión selectiva, incluyendo anticuerpos anti-polipéptido similar a IL-17 agonistas y antagonistas.

20 También se da a conocer un kit que comprende agentes de unión selectiva a polipéptido similar a IL-17 (tal como anticuerpos) y otros reactivos útiles para detectar los niveles de polipéptido similar a IL-17 en muestras biológicas. Tales reactivos pueden incluir un marcador detectable, suero bloqueantes, muestras control positivas y negativas, y reactivos de detección.

25 Los polipéptidos similares a IL-17 tal como se dan a conocer en el presente documento pueden usarse para clonar receptores de polipéptido similar a IL-17, usando una estrategia de clonación de expresión. Puede usarse polipéptido similar a IL-17 radiomarcado (¹²⁵-yodo) o polipéptido similar a IL-17 etiquetado por afinidad/actividad (tal como una fusión de Fc o una fusión de fosfatasa alcalina) en ensayos de unión para identificar un tipo de célula o línea celular o tejido que expresa receptor(es) de polipéptido similar a IL-17. El ARN aislado de tales células o tejidos puede convertirse en ADNc, clonarse en un vector de expresión de mamífero y transfectarse en células de mamífero (tales como células COS o 293) para crear una biblioteca de expresión. Entonces puede usarse polipéptido similar a IL-17 radiomarcado o etiquetado como un ligando de afinidad para identificar y aislar de esta biblioteca el subconjunto de células que expresan el/los receptor(es) de polipéptido similar a IL-17 sobre su superficie. Entonces puede aislarse ADN a partir de éstas células y transfectarse en células de mamífero para crear una biblioteca de expresión secundaria en la que la fracción de células que expresan receptor(es) de polipéptido similar a IL-17 es muchas veces superior que en la biblioteca original. Este procedimiento de enriquecimiento puede repetirse de manera iterativa hasta que se aísla un único clon recombinante que contiene un receptor de polipéptido similar a IL-17. El aislamiento del/de los receptor(es) de polipéptido similar a IL-17 es útil para identificar o desarrollar agonistas y antagonistas novedosos de la ruta de señalización del polipéptido similar a IL-17. Tales agonistas y antagonistas incluyen receptor(es) de polipéptido similar a IL-17 soluble(s), anticuerpos anti-receptor de polipéptido similar a IL-17, moléculas pequeñas, proteínas, péptidos, hidratos de carbono, lípidos u oligonucleótidos antisentido, y pueden usarse para tratar, prevenir o diagnosticar una o más enfermedades o trastornos, incluyendo los descritos en el presente documento.

Ensayos para detectar otros moduladores de la actividad de polipéptido similar a IL-17

35 En algunas situaciones, puede ser deseable identificar moléculas que son moduladores, es decir, agonistas o antagonistas, de la actividad de polipéptido similar a IL-17. Pueden identificarse moléculas naturales o sintéticas que modulan el polipéptido similar a IL-17 usando uno o más ensayos de selección, tales como los descritos en el presente documento. Tales moléculas pueden administrarse o bien de una manera *ex vivo*, o de una manera *in vivo* mediante inyección, o bien mediante administración oral, dispositivo de implantación o similares.

“Molécula(s) de prueba” se refiere a la(s) molécula(s) que se evalúa(n) para determinar su capacidad para modular (es decir, aumentar o disminuir) la actividad de un polipéptido similar a IL-17. Lo más comúnmente, una molécula de prueba interactuará directamente con un polipéptido similar a IL-17. Sin embargo, también se contempla que una molécula de prueba también puede modular la actividad de polipéptido similar a IL-17 indirectamente, tal como afectando a la expresión del gen de polipéptido similar a IL-17 o uniéndose a un compañero de unión de polipéptido similar a IL-17 (por ejemplo, receptor o ligando). En una realización, una molécula de prueba se unirá a un polipéptido similar a IL-17 con una constante de afinidad de al menos aproximadamente 10^{-6} M, preferiblemente de aproximadamente 10^{-8} M, más preferiblemente de aproximadamente 10^{-9} M e incluso más preferiblemente de aproximadamente 10^{-10} M.

La presente invención abarca métodos para identificar compuestos que interactúan con polipéptidos similares a IL-17. En determinadas realizaciones, se incuba un polipéptido similar a IL-17 con una molécula de prueba en condiciones que permiten la interacción de la molécula de prueba con un polipéptido similar a IL-17, y puede medirse el grado de la interacción. La(s) molécula(s) de prueba puede(n) seleccionarse en una forma sustancialmente pura o en una mezcla en bruto.

En determinadas realizaciones, un agonista o antagonista de polipéptido similar a IL-17 puede ser una proteína, un péptido, un hidrato de carbono, un lípido o una molécula de peso molecular pequeño que interactúa con el polipéptido similar a IL-17 regulando su actividad. Las moléculas que regulan la expresión de polipéptido similar a IL-17 incluyen ácidos nucleicos que son complementarios a ácidos nucleicos que codifican para un polipéptido similar a IL-17, o son complementarios a secuencias de ácido nucleico que dirigen o controlan la expresión de polipéptido similar a IL-17, y que actúan como reguladores antisentido de la expresión.

Una vez que se ha identificado que un conjunto de moléculas de prueba interactúa con un polipéptido similar a IL-17, las moléculas pueden evaluarse adicionalmente para determinar su capacidad para aumentar o disminuir la actividad del polipéptido similar a IL-17. La medición de la interacción de moléculas de prueba con polipéptidos similares a IL-17 puede llevarse a cabo en varios formatos, incluyendo ensayos de unión basados en células, ensayos de unión a membranas, ensayos en fase de disolución e inmunoensayos. En general, las moléculas de prueba se incuban con un polipéptido similar a IL-17 durante un periodo de tiempo especificado y se determina la actividad del polipéptido similar a IL-17 mediante uno o más ensayos para medir la actividad biológica.

La interacción de moléculas de prueba con polipéptidos similares a IL-17 también puede someterse a ensayo directamente usando anticuerpos policlonales o monoclonales en un inmunoensayo. Alternativamente, pueden usarse formas modificadas de polipéptidos similares a IL-17 que contienen etiquetas de epítopo tal como se describen en el presente documento en inmunoensayos.

En el caso de que los polipéptidos similares a IL-17 presenten actividad biológica a través de una interacción con un compañero de unión (por ejemplo, un receptor o un ligando), puede usarse una variedad de ensayos *in vitro* para medir la unión de un polipéptido similar a IL-17 al compañero de unión correspondiente (tal como un agente de unión selectiva, receptor o ligando). Estos ensayos pueden usarse para seleccionar moléculas de prueba según su capacidad para aumentar o disminuir la velocidad y/o el grado de unión de un polipéptido similar a IL-17 a su compañero de unión. En un ensayo, se inmoviliza un polipéptido similar a IL-17 en los pocillos de una placa de microtitulación. Entonces se añaden el compañero de unión de polipéptido similar a IL-17 radiomarcado (por ejemplo, compañero de unión de polipéptido similar a IL-17 yodado) y la(s) molécula(s) de prueba o bien de una vez (en cualquier orden) o bien simultáneamente a los pocillos. Tras la incubación, los pocillos pueden lavarse y contarse (usando un contador de centelleo) para medir la radioactividad para determinar el grado con el que el compañero de unión se une al polipéptido similar a IL-17. Normalmente, las moléculas se someterán a prueba a lo largo de un intervalo de concentraciones, y puede usarse una serie de pocillos de control que carecen de uno o más elementos de los ensayos de prueba para determinar la exactitud en la evaluación de los resultados. Una alternativa a este método implica invertir las “posiciones” de las proteínas, es decir, inmovilizar el compañero de unión de polipéptido similar a IL-17 en los pocillos de la placa de microtitulación, incubar con la molécula de prueba y el polipéptido similar a IL-17 radiomarcado y determinar el grado de unión de polipéptido similar a IL-17. Véase, por ejemplo, el capítulo 18, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Nueva York, NY (1995).

Como una alternativa al radiomarcaje, puede conjugarse un polipéptido similar a IL-17 o su compañero de unión con biotina y entonces puede detectarse la presencia de proteína biotinilada usando estreptavidina unida a una enzima, tal como peroxidasa del rábano (HRP) o fosfatasa alcalina (AP), que puede detectarse colorimétricamente o mediante etiquetado fluorescente de estreptavidina. También puede usarse un anticuerpo dirigido frente a un polipéptido similar a IL-17 o frente a una pareja de unión de polipéptido similar a IL-17 y conjugado con biotina y puede detectarse tras la incubación con estreptavidina unida a enzima unida a AP o HRP.

También puede inmovilizarse un polipéptido similar a IL-17 o un compañero de unión de polipéptido similar a IL-17 mediante unión a perlas de agarosa, perlas acrílicas u otros tipos de tales sustratos de fase sólida inerte. El complejo de sustrato-proteína puede colocarse en una disolución que contiene la proteína complementaria y el compuesto de prueba. Tras la incubación, las perlas pueden precipitarse mediante centrifugación, y la cantidad de unión entre un polipéptido similar a IL-17 y su compañero de unión puede evaluarse usando los métodos descritos

en el presente documento. Alternativamente, el complejo de sustrato-proteína puede inmovilizarse en una columna, y la molécula de prueba y la proteína complementaria se hacen pasar a través de la columna. Entonces puede evaluarse la formación de un complejo entre un polipéptido similar a IL-17 y su pareja de unión usando cualquiera de las técnicas expuestas en el presente documento, es decir, radiomarcaje, unión a anticuerpos o similares.

5 Otro ensayo *in vitro* que es útil para identificar una molécula de prueba que aumenta o disminuye la formación de un complejo entre un polipéptido similar a IL-17 y un compañero de unión de polipéptido similar a IL-17 es un sistema de detector de resonancia de plasmones superficiales tal como el sistema de ensayo BIAcore (Pharmacia, Piscataway, NJ). El sistema BIAcore puede llevarse a cabo usando el protocolo del fabricante. Este ensayo implica esencialmente la unión covalente de o bien polipéptido similar a IL-17 o bien un compañero de unión de polipéptido similar a IL-17 a un chip sensor recubierto con dextrano que se ubica en un detector. Entonces, el compuesto de prueba y la otra proteína complementaria pueden inyectarse, o bien simultánea o bien secuencialmente, en la cámara que contiene el chip sensor. La cantidad de proteína complementaria que se une puede evaluarse basándose en el cambio en la masa molecular que está asociada físicamente con el lado recubierto con dextrano del chip sensor; el cambio en la masa molecular puede medirse mediante el sistema de detector.

15 En algunos casos, puede ser deseable evaluar dos o más compuestos de prueba juntos para determinar su capacidad de aumentar o disminuir la formación de un complejo entre un polipéptido similar a IL-17 y un compañero de unión de polipéptido similar a IL-17. En estos casos, los ensayos expuestos en el presente documento pueden modificarse fácilmente añadiendo tal(es) compuesto(s) de prueba adicional(es) o bien simultáneamente con o bien posteriormente al primer compuesto de prueba. El resto de las etapas en el ensayo son tal como se expone en el presente documento.

20 Pueden usarse ensayos *in vitro* tales como los descritos en el presente documento ventajosamente para examinar grandes números de compuestos para determinar los efectos sobre la formación de complejos mediante un polipéptido similar a IL-17 y un compañero de unión de polipéptido a IL-17. Los ensayos pueden automatizarse para examinar compuestos generados en las bibliotecas de presentación en fago, de péptidos sintéticos y de síntesis química.

25 Los compuestos que aumentan o disminuyen la formación de un complejo entre un polipéptido similar a IL-17 y un compañero de unión de polipéptido a IL-17 también pueden examinarse en cultivos celulares usando células y líneas celulares que expresan o bien polipéptido similar a IL-17 o bien compañero de unión de polipéptido similar a IL-17. Pueden obtenerse células y líneas celulares a partir de cualquier mamífero, pero preferiblemente serán de fuentes de ser humano u otro primate, caninas o de roedores. La unión de un polipéptido similar a IL-17 a células que expresan el compañero de unión de polipéptido similar a IL-17 en la superficie se evalúa en presencia o ausencia de moléculas de prueba, y el grado de unión puede determinarse mediante, por ejemplo, citometría de flujo usando un anticuerpo biotinilado frente a un compañero de unión de polipéptido a IL-17. Pueden usarse ventajosamente ensayos de cultivo celular para evaluar adicionalmente compuestos que puntúan positivos en ensayos de unión a proteínas descritos en el presente documento.

30 También pueden usarse cultivos celulares para examinar el impacto de un candidato farmacológico. Por ejemplo, los candidatos farmacológicos pueden disminuir o aumentar la expresión del gen de polipéptido similar a IL-17. En determinadas realizaciones, la cantidad de polipéptido similar a IL-17 que se produce puede medirse tras la exposición del cultivo celular al candidato farmacológico. En determinadas realizaciones, puede detectarse el impacto real del candidato farmacológico sobre el cultivo celular. Por ejemplo, la sobreexpresión de un gen particular puede tener un impacto particular sobre el cultivo celular. En tales casos, puede someterse a prueba la capacidad de un candidato farmacológico para aumentar o disminuir la expresión del gen o su capacidad para prevenir o inhibir un impacto particular sobre el cultivo celular. En otros ejemplos, la producción de un producto metabólico particular tal como un fragmento de un polipéptido puede dar como resultado, o estar asociado con, una enfermedad o un estado patológico. En tales casos, puede someterse a prueba la capacidad de un candidato farmacológico para disminuir la producción de un producto metabólico de este tipo en un cultivo celular.

Inhibidores de P-38

35 Cuando se desea la intervención entre el estímulo extracelular y la secreción de IL-1 y/o TNF α a partir de una célula, esto puede lograrse bloqueando la transducción de señales a través de la inhibición de una cinasa que se encuentra en la ruta de señalización. Esto puede lograrse por ejemplo a través de la inhibición de "P-38" (también denominada "RK" o "SAPK-2", Lee *et al.*, Nature, 372:739 (1994)), una serina/treonina (ser/thr) cinasa conocida. Véase Han *et al.*, Biochimica Biophysica Acta, 1265: 224-227 (1995). Se ha mostrado una relación lineal para la eficacia en un ensayo de unión competitiva a P-38, y el mismo inhibidor que reduce la secreción de IL-1 de monocitos tras la estimulación con LPS. Tras la estimulación con LPS de monocitos, se ha mostrado que los niveles de ARN mensajero para TNF α aumentan 100 veces, pero los niveles de proteína de TNF α aumentaron 10.000 veces. Por tanto, se produce una amplificación considerable de la señalización de TNF al nivel de la traducción. Parece que la inhibición de P-38 reduce la eficacia de la traducción, y se han encontrado pruebas adicionales de que TNF α está bajo control traduccional en los experimentos de delección de Beutler *et al.* y Lee, en los que se eliminan segmentos de ARNm no traducidos en 3' (UTR en 3') dando como resultado alta eficacia de la traducción para TNF α . Notablemente, los inhibidores de P-38 no tienen un efecto sobre el nivel de TNF α (es decir, eficacia de la traducción) cuando se

delecionaron los segmentos apropiados de ARNm de TNF α .

Se ha encontrado que niveles elevados de TNF α y/o IL-1 pueden contribuir a la aparición, etiología o exacerbación de varios estados patológicos, incluyendo, pero sin limitarse a: artritis reumatoide; osteoartritis; espondilitis reumatoide; artritis gotosa; enfermedad inflamatoria del intestino; síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS); psoriasis; enfermedad de Crohn; rinitis alérgica; colitis ulcerosa; anafilaxis; dermatitis por contacto; asma; terapia antiviral incluyendo los virus sensibles a la inhibición con TNF α (VIH-1, VIH-2, VIH-3), citomegalovirus (CMV), influenza, adenovirus, y los virus del herpes incluyendo VHS-1, VHS-2, y herpes zóster; degeneración muscular; caquexia; síndrome de Reiter; diabetes tipo II; enfermedades de resorción ósea; reacción de injerto contra huésped; lesión por isquemia-reperusión; aterosclerosis; traumatismo craneoencefálico; enfermedad de Alzheimer; esclerosis múltiple; malaria cerebral; septicemia; choque septicémico; síndrome de choque tóxico; fiebre y mialgias debidas a infección.

Se han descrito compuestos de imidazol, pirrol, piridina, pirimidina y similares sustituidos para su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por citocinas mediante la inhibición de citocinas proinflamatorias, tales como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF. Se han descrito imidazoles sustituidos para su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por citocinas en la patente estadounidense n.º 5.593.992; los documentos WO 93/14081; WO 97/18626; WO 96/21452; WO 96/21654; WO 96/40143; WO 97/05878; WO 97/05878.

Se han descrito imidazoles sustituidos para su uso en el tratamiento de inflamación en la patente estadounidense n.º 3.929.807. Se han descrito compuestos de pirrol sustituidos para su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por citocinas en los documentos WO 97/05877; WO 97/05878; WO 97/16426; WO 97/16441; y WO 97/16442. Se han descrito compuestos de pirrol condensados con arilo y heteroarilo sustituidos para su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por citocinas en el documento WO 98/22457. Se han descrito compuestos de piridina, pirimidina, pirimidinona y piridazina sustituidos para su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por citocinas en los documentos WO 98/24780; WO 98/24782; WO 99/24404; y WO 99/32448.

Internalización de proteínas

La secuencia de proteína tat (de VIH) puede usarse para internalizar proteínas en una célula. Véase por ejemplo, Falwell *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:664-668 (1994). Por ejemplo, se ha descrito que una secuencia de 11 aminoácidos (YGRKKRRQRRR; SEQ ID NO: 13) de la proteína tat de VIH (denominada "dominio de transducción de proteína", o TAT PDT) media el suministro a través de la membrana citoplasmática y la membrana nuclear de una célula. Véanse Schwarze *et al.*, Science, 285:1569-1572 (1999); y Nagahara *et al.*, Nature Medicine, 4:1449-1452 (1998). En estos procedimientos, se preparan constructos de FITC (FITC-GGGYGRKKRRQRRR; SEQ ID NO: 14) que se unen a las células tal como se observa mediante análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y estos constructos penetran en los tejidos tras administración i.p. A continuación, se construyen proteínas de fusión tat-bga1. Las células tratadas con este constructo demuestran actividad b-gal. Tras la inyección, se ha encontrado que varios tejidos, incluyendo tejido hepático, renal, pulmonar, cardíaco y cerebral, demuestran expresión usando estos procedimientos. Se cree que estas construcciones experimentaron cierto grado de desplegamiento con el fin de entrar en la célula; como tal, puede requerirse replegamiento tras entrar en la célula.

Por tanto, se apreciará que la secuencia de proteína tat puede usarse para internalizar una proteína o polipéptido deseado en una célula. Por ejemplo, usando la secuencia de proteína tat, puede administrarse intracelularmente un antagonista de polipéptido similar a IL-17 (tal como agente de unión selectiva, molécula pequeña, receptor soluble u oligonucleótido antisentido anti-polipéptido similar a IL-17) para inhibir la actividad de una molécula similar a IL-17. Tal como se usa en el presente documento, El término "molécula similar a IL-17" se refiere tanto a moléculas de ácido nucleico de polipéptido similar a IL-17 como a polipéptidos similares a IL-17 tal como se definen en el presente documento. Cuando se desee, la propia proteína similar a IL-17 también puede administrarse internamente a una célula usando estos procedimientos. Véase también, Strauss, E., "Introducing Proteins Into the Body's Cells", Science, 285:1466-1467 (1999).

Usos terapéuticos

Se ha encontrado expresión del polipéptido similar a IL-17 humana en los siguientes tipos de células: testículos, próstata, glándula mamaria, ganglio linfático y fémur. Se ha encontrado expresión del polipéptido similar a IL-17 de ratón en los siguientes tipos de células: células T y células embrionarias.

Una lista no exclusiva de enfermedades agudas y crónicas que pueden tratarse, diagnosticarse, mejorarse o prevenirse con los ácidos nucleicos, polipéptidos, y agonistas y antagonistas de polipéptido similar a IL-17 de la presente descripción incluye:

- El diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades que implican disfunción del sistema inmunitario. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis inflamatoria, osteoartritis, enfermedad articular inflamatoria, enfermedad autoinmunitaria incluyendo vasculitis autoinmunitaria, esclerosis múltiple, lupus, diabetes (por ejemplo, diabetes de insulina), enfermedad inflamatoria del intestino, rechazo de trasplante, enfermedad de injerto contra huésped y estados inflamatorios que resultan de tensión,

- distensión, daño del cartílago, traumatismo, cirugía ortopédica, infección u otros procesos patológicos. Otras enfermedades influidas por la disfunción del sistema inmunitario se abarcan dentro del alcance de la descripción, incluyendo pero sin limitarse a, alergias. Los ácidos nucleicos, polipéptidos, y agonistas y antagonistas de polipéptido similar a IL-17 de la invención también pueden usarse para inhibir la proliferación de células T, para inhibir la activación de células T, y/o para inhibir la proliferación de células B y/o la secreción de inmunoglobulina.
- 5
- El diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades que implican infección. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, lepra, infecciones virales tales como hepatitis o VIH, infección bacteriana tal como enfermedades asociadas a *Clostridium*, incluyendo diarrea asociada a *Clostridium*, tuberculosis pulmonar, enfermedad febril aguda de bacterias tal como o virus, fiebre, respuesta de fase aguda del hígado, septicemia, choque septicémico. Otras enfermedades que implican infección se abarcan dentro del alcance de la descripción.
- 10
- El diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades que implican trastornos del peso. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a obesidad, anorexia, caquexia, incluyendo caquexia inducida por SIDA, miopatías (por ejemplo, metabolismo de proteínas musculares, tal como en septicemia) e hipoglucemia. Otras enfermedades que implican trastornos del peso se abarcan dentro del alcance de la descripción.
- 15
- El diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades que implican disfunción neuronal. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, neurotoxicidad (por ejemplo, como la inducida por VIH), ELA, lesión cerebral, estrés, depresión, nocicepción y otros dolores (incluyendo dolor relacionado con cáncer), hiperalgesia, epilepsia, alteración del aprendizaje y trastornos de la memoria, alteraciones del sueño y neuropatías periféricas y centrales. Otros trastornos neurológicos se abarcan dentro del alcance de la descripción.
- 20
- El diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades que implican el pulmón. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, lesión pulmonar aguda o crónica incluyendo enfermedad pulmonar intersticial, síndrome de enfermedad respiratoria aguda, hipertensión pulmonar, enfisema, fibrosis quística, fibrosis pulmonar y asma. Otras enfermedades del pulmón se abarcan dentro del alcance de la descripción.
- 25
- El diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades que implican la piel. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, psoriasis, eccema y cicatrización de heridas. Otras enfermedades de la piel se abarcan dentro del alcance de la descripción.
- El diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades que implican el riñón. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, glomerulonefritis aguda y crónica. Otras enfermedades del riñón se abarcan dentro del alcance de la descripción.
- 30
- El diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades que implican los huesos. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, osteoporosis, osteopetrosis, osteogénesis imperfecta, enfermedad de Paget, enfermedad periodontal, enfermedad de la articulación mandibular temporal e hipercalcemia. Otras enfermedades de los huesos se abarcan dentro del alcance de la descripción.
- 35
- El diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades que implican el sistema vascular. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a hemorragia o accidente cerebrovascular, choque hemorrágico, isquemia, incluyendo isquemia cardíaca e isquemia cerebral (por ejemplo, lesión cerebral como resultado de traumatismo, epilepsia, hemorragia o accidente cerebrovascular, cada uno de los cuales puede conducir a neurodegeneración), aterosclerosis, insuficiencia cardíaca congestiva; reestenosis, lesión por reperfusión y angiogénesis. Otras enfermedades del sistema vascular se abarcan dentro del alcance de la descripción.
- 40
- El diagnóstico y/o el tratamiento de células tumorales. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, linfomas, sarcoma de huesos, leucemia mielógena aguda y crónica (LMA y LMC) incluyendo leucemias mielomonocíticas (LMA M4) y otras leucemias, mieloma múltiple, cáncer de pulmón, de mama, metástasis tumoral y efectos secundarios de la terapia de radiación. Otras enfermedades que implican células tumorales se abarcan dentro del alcance de la descripción.
- 45
- El diagnóstico y/o el tratamiento de trastornos del sistema reproductor. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, esterilidad, aborto espontáneo, parto prematuro y endometriosis. Otras enfermedades que implican el sistema reproductor se abarcan dentro del alcance de la descripción.
- El diagnóstico y/o el tratamiento de trastornos oculares. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, enfermedad ocular inflamatoria, que puede estar asociada con, por ejemplo, trasplante de córnea; degeneración de la retina, ceguera, degeneración macular, glaucoma, uveítis y neuropatía de la retina. Otras enfermedades oculares se abarcan dentro del alcance de la descripción.
- 50
- El diagnóstico y/o el tratamiento de enfermedades que implican inflamación. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen pero no se limitan a los descritos en el presente documento.
- 55
- La invención proporciona un uso de un anticuerpo antagonista específico para un polipéptido que consiste en la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma que comprende 25, 50, 75, 100 ó 150 aminoácidos contiguos, para la preparación de un medicamento para tratar fibrosis quística, síndrome de enfermedad respiratoria aguda o enfisema.

5 La invención proporciona además un anticuerpo antagonista específico para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma que comprende 25, 50, 75, 100 ó 150 aminoácidos contiguos, para su uso en el tratamiento de fibrosis quística, síndrome de enfermedad respiratoria aguda o enfisema.

10 La invención proporciona además un uso de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista específico para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma que comprende 25, 50, 75, 100 ó 150 aminoácidos contiguos, y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable, para la preparación de un medicamento para tratar fibrosis quística, síndrome de enfermedad respiratoria aguda o enfisema.

15 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista específico para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma que comprende 25, 50, 75, 100 ó 150 aminoácidos contiguos, y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de fibrosis quística, síndrome de enfermedad respiratoria aguda o enfisema.

20 Se ha encontrado también que los presentes ácidos nucleicos de polipéptido similar a IL-17, polipéptidos y agonistas dados a conocer en el presente documento pueden aumentar la celularidad de médula ósea y bazo, los eosinófilos, las células formadoras de colonias (CFC) y la producción de linfocitos. Los presentes polipéptidos y ácidos nucleicos de polipéptido similar a IL-17 modulan por tanto el crecimiento de células hematopoyéticas, incluyendo la estimulación de la proliferación y/o diferenciación de al menos 1 progenitor temprano o multipotente asignado a al menos 1 linaje de granulocitos y/o megacariocitos. A la inversa, los antagonistas de polipéptido similar a IL-17 pueden disminuir los niveles y/o la producción de estas células.

25 Además, los agonistas, polipéptidos y ácidos nucleicos de polipéptido similar a IL-17 dados a conocer en el presente documento tienen actividad proinflamatoria. Los polipéptidos similares a IL-17 inducen la producción de citocinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-1 α , IL-1 β e IL-6.

30 Adicionalmente, los antagonistas, agonistas, polipéptidos y ácidos nucleicos de polipéptido similar a IL-17 dados a conocer en el presente documento pueden usarse para estimular la hematopoyesis y producción de neutrófilos, granulocitos o plaquetas, y por tanto son útiles para pacientes que se someten a quimioterapia. Los antagonistas, agonistas, polipéptidos y ácidos nucleicos de polipéptido similar a IL-17 dados a conocer en el presente documento pueden usarse también para tratar infecciones virales o bacterianas, enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario, anemia, leucemia, trombocitopenia, uremia, enfermedad de Von Willebrand, disfunción cardiovascular postoperatoria, tratamiento de insuficiencia de médula ósea relacionada con SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) y enfermedades inflamatorias del sistema gastrointestinal, las articulaciones y los pulmones.

35 Otras enfermedades que pueden tratarse usando agentes dentro del alcance de la presente descripción incluyen pancreatitis aguda, síndrome de fatiga crónica, fibromialgia y enfermedad de Kawasaki (MLNS).

40 Otras enfermedades asociadas con niveles no deseados de uno o más de IL-1, IL-1ra, el ligando del presente polipéptido similar a IL-17 y/o el presente polipéptido similar a IL-17 por sí mismo se abarcan dentro del alcance de la presente descripción. Los niveles no deseados incluyen niveles excesivos y/o inferiores a los normales de IL-1, IL-1ra, el/los receptor(es) del presente polipéptido similar a IL-17 y/o los polipéptidos similares a IL-17 descritos en el presente documento.

45 Los inhibidores de IL-1 incluyen cualquier proteína que pueda prevenir específicamente la activación de receptores celulares para IL-1, lo que puede resultar de cualquiera de varios mecanismos. Tales mecanismos incluyen la regulación por disminución de la producción de IL-1, unión a IL-1 libre, interferencia con la unión de IL-1 a su receptor, interferencia con la formación del complejo de receptor de IL-1 (es decir, asociación del receptor de IL-1 con la proteína accesoria del receptor de IL-1) o interferencia con la modulación de la señalización de IL-1 tras la unión a su receptor. Las clases de inhibidores de interleucina-1 incluyen:

- antagonistas de receptores de interleucina-1 tales como IL-1ra, tal como se describen en el presente documento;
- anticuerpos monoclonales anti-receptor de IL-1 (por ejemplo, documento EP 623674);
- 50 • proteínas de unión a IL-1 tales como receptores de IL-1 solubles (por ejemplo, patente estadounidense n.º 5.492.888, patente estadounidense n.º 5.488.032 y patente estadounidense n.º 5.464.937, patente estadounidense n.º 5.319.071 y patente estadounidense n.º 5.180.812;
- anticuerpos monoclonales anti-IL-1 (por ejemplo, documentos WO 9501997, WO 9402627, WO 9006371, patente estadounidense n.º 4.935.343, documentos EP 364778, EP 267611 y EP 220063;

• proteínas accesorias de receptores de IL-1 y anticuerpos frente a las mismas (por ejemplo, documento WO 96/23067);

• inhibidores de enzima convertidora de interleucina-1 β (ICE) o caspasa I, que puede usarse para inhibir la producción y secreción de IL-1 beta;

5 • inhibidores de proteasa de interleucina-1 β ;

• otros compuestos y proteínas que bloquean la síntesis *in vivo* o la liberación extracelular de IL-1.

Se dan a conocer inhibidores de IL-1 a modo de ejemplo en las siguientes referencias:

patentes estadounidenses n.ºs 5747444; 5359032; 5608035; 5843905; 5359032; 5866576; 5869660; 5869315; 5872095; 5955480;

10 solicitudes de patente internacional (WO) 98/21957, 96/09323, 91/17184, 96/40907, 98/32733, 98/42325, 98/44940, 98/47892, 98/56377, 99/03837, 99/06426, 99/06042, 91/17249, 98/32733, 98/17661, 97/08174, 95/34326, 99/36426 y 99/36415;

solicitudes de patente europea (EP) 534978 y 894795; y solicitud de patente francesa FR 2762514.

15 El antagonista de receptor de interleucina-1 (IL-1ra) es una proteína humana que actúa como inhibidor natural de interleucina-1. Se describen antagonistas de receptores preferidos (incluyendo IL-1ra y variantes y derivados del mismo), así como métodos de preparación y uso de los mismos, en la patente estadounidense n.º 5.075.222; los documentos WO 91/08285; WO 91/17184; AU 9173636; WO 92/16221; WO 93/21946; WO 94/06457; WO 94/21275; FR 2706772; WO 94/21235; DE 4219626, WO 94/20517; WO 96/22793; WO 97/28828; y WO 99/36541. Las proteínas incluyen antagonistas de receptores de IL-1 glicosilados así como no glicosilados.

20 Específicamente, se dan a conocer tres formas a modo de ejemplo de IL-1ra y variantes del mismo y se describen en la patente 5.075.222. La primera de éstas, denominada "IL-1i" en la patente 5.075.222, se caracteriza como una molécula de 22-23 kD en SDS-PAGE con un punto isoeléctrico aproximado de 4,8, que eluye de una columna MonoQ FPLC a aproximadamente NaCl 52 mM en tampón Tris, pH 7,6. La segunda, IL-1ra β , se caracteriza como una proteína de 22-23 kD, que eluye de una columna MonoQ a NaCl 48 mM. Tanto IL-1ra α como IL-1ra β están glicosiladas. La tercera, IL-1rax, se caracteriza como una proteína de 20 kD, que eluye de una columna MonoQ a NaCl 48 mM, y no está glicosilada. La patente estadounidense n.º 5.075.222 también da a conocer métodos para aislar los genes responsables de la codificación de los inhibidores, clonar el gen en vectores y tipos de células adecuados y expresar el gen para producir los inhibidores.

30 Los expertos en la técnica reconocerán que pueden hacerse muchas combinaciones de deleciones, inserciones y sustituciones (individual o colectivamente "variante(s)" en el presente documento) dentro de las secuencias de aminoácidos de IL-1ra, siempre que la molécula resultante sea biológicamente activa (por ejemplo, posee la capacidad para afectar a una o más de las enfermedades y trastornos tales como los mencionados en el presente documento.)

35 Tal como se contempla por la presente invención, puede administrarse un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17 (incluyendo, pero sin limitarse a, agentes de unión selectiva anti-polipéptido similar a IL-17 [tales como anticuerpos], receptores de polipéptido similar a IL-17 [tales como receptores de polipéptido similar a IL-17 solubles], moléculas pequeñas y oligonucleótidos antisentido como coadyuvante a otra terapia y también con otras composiciones farmacéuticas adecuadas para la indicación que está tratándose. Un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o el propio receptor de un polipéptido similar a IL-17, y cualquiera de una o más terapias adicionales o formulaciones farmacéuticas pueden administrarse por separado, secuencialmente o simultáneamente.

40 En una realización específica, la presente descripción se refiere al uso de un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 en combinación (tratamiento previo, tratamiento posterior o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más inhibidores de TNF para el tratamiento o la prevención de las enfermedades y trastornos mencionados en el presente documento.

45 Tales inhibidores de TNF incluyen compuestos y proteínas que bloquean la síntesis *in vivo* o la liberación extracelular de TNF. En una realización específica, la presente descripción se refiere al uso de un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 en combinación (tratamiento previo, tratamiento posterior o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más de los siguientes inhibidores de TNF: proteínas de unión a TNF (receptor de TNF soluble de tipo I y receptor de TNF soluble de tipo II ("sTNFR")), tal como se definen en el presente documento), anticuerpos anti-TNF, factor estimulante de las colonias de granulocitos; talidomida; BN 50730; tenidap; E 5531; tiapafant PCA 4248; nimesulida; panavir; rolipram; RP 73401; péptido T; MDL 201.449A; clorhidrato de (1R,3S)-cis-1-[9-(2,6-diaminopurinil)]-3-hidroxi-4-ciclopenteno; (1R,3R)-trans-1-(9-(2,6-diamino)purina)-3-acetoxiciclopentano; clorhidrato de (1R,3R)-trans-1-[9-adenil]-3-azidociclopentano y (1R,3R)-trans-1-(6-hidroxi-purin-9-il)-3-azidociclo-pentano. Se dan a conocer en la técnica proteínas de unión a

TNF (documentos EP 308 378, EP 422 339, GB 2 218 101, EP 393 438, WO 90/13575, EP 398 327, EP 412 486, WO 91/03553, EP 418 014, JP 127,800/1991, EP 433 900, patente estadounidense n.º 5.136.021, documentos GB 2 246 569, EP 464 533, WO 92/01002, WO 92/13095, WO 92/16221, EP 512 528, EP 526 905, WO 93/07863, EP 568 928, WO 93/21946, WO 93/19777, EP 417 563, WO94/06476 y solicitud internacional PCT n.º PCT/US97/12244).

Por ejemplo, los documentos EP 393 438 y EP 422 339 enseñan las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de un receptor de TNF soluble de tipo I (también conocido como "sTNFR-I" o "inhibidor de TNF de 30 kDa") y un receptor de TNF soluble de tipo II (también conocido como "sTNFR-II" o "inhibidor de TNF de 40 kDa"), denominados conjuntamente "sTNFR", así como formas modificadas de los mismos (por ejemplo, fragmentos, derivados funcionales y variantes). Los documentos EP 393 438 y EP 422 339 también dan a conocer métodos para aislar los genes responsables de la codificación de los inhibidores, la clonación del gen en vectores y tipos de células adecuados y la expresión del gen para producir los inhibidores. Adicionalmente, también se han dado a conocer formas polivalentes (es decir, moléculas que comprenden más de un resto activo) de sTNFR-I y sTNFR-II. En una realización, la forma polivalente puede construirse acoplado químicamente al menos un inhibidor de TNF y otro resto con cualquier ligador clínicamente aceptable, por ejemplo polietilenglicol (documentos WO 92/16221 y WO 95/34326), mediante un ligador peptídico (Neve *et al.* (1996), *Cytokine*, 8 (5): 365-370, mediante acoplamiento químico a biotina y luego unión a avidina (documento WO 91/03553) y, finalmente, combinando moléculas de anticuerpos quiméricos (patente estadounidense 5.116.964, documentos WO 89/09622, WO 91/16437 y EP 315062).

Los anticuerpos anti-TNF incluyen anticuerpo Fab MAK 195F (Holler *et al.* (1993), 1st International Symposium on Cytokines in Bone Marrow Transplantation, 147); anticuerpo monoclonal anti-TNF CDP 571 (Rankin *et al.* (1995), *British Journal of Rheumatology*, 34:334-342); anticuerpo monoclonal anti-factor de necrosis tumoral murino BAY X 1351 (Kieft *et al.* (1995), 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, página 9); anticuerpo monoclonal anti-TNF CenTNF cA2 (Elliott *et al.* (1994), *Lancet*, 344:1125-1127 y Elliott *et al.* (1994), *Lancet*, 344:1105-1110).

En una realización específica, la presente descripción se refiere al uso de agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 en combinación (tratamiento previo, tratamiento posterior o tratamiento simultáneo) con antígeno fas humano secretado o soluble o versiones recombinantes del mismo (documento WO 96/20206 y Mountz *et al.*, *J. Immunology*, 155:4829-4837; y documento EP 510 691. El documento WO 96/20206 da a conocer antígeno fas humano secretado (nativo y recombinante, incluyendo una proteína de fusión de Ig), métodos para aislar los genes responsables de la codificación del antígeno fas humano recombinante soluble, métodos para clonar el gen en vectores y tipos de células adecuados y métodos para expresar el gen para producir los inhibidores. El documento EP 510 691 enseña ADN que codifican para antígeno fas humano, incluyendo antígeno fas soluble, vectores que expresan dichos ADN y transformantes transfectados con el vector. Cuando se administran por vía parenteral, las dosis de una proteína de fusión de antígeno fas secretado o soluble son cada una generalmente de desde aproximadamente 1 microgramo/kg hasta aproximadamente 100 microgramos/kg.

El tratamiento actual de las enfermedades y trastornos mencionados en el presente documento, incluyendo inflamación aguda y crónica tal como enfermedades reumáticas, incluye comúnmente el uso de fármacos de primera línea para el control del dolor y la inflamación; estos fármacos se clasifican como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los tratamientos secundarios incluyen corticosteroides, fármacos antirreumáticos de acción lenta (FARAL) o fármacos modificadores de la enfermedad (ME). Puede encontrarse información referente a los siguientes compuestos en *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, decimosexta edición, Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Merck & Co., Rahway, NJ (1992) y en *Pharmaprojects*, PJB Publications Ltd.

En una realización específica, la presente descripción se refiere al uso de un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 y cualquiera de uno o más AINE para el tratamiento de las enfermedades y trastornos mencionados en el presente documento, incluyendo inflamación aguda y crónica tal como enfermedades reumáticas; y enfermedad de injerto contra huésped. Los AINE deben su acción antiinflamatoria, al menos en parte, a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Goodman y Gilman en *"The Pharmacological Basis of Therapeutics"*, MacMillan 7ª edición (1985)). Los AINE pueden caracterizarse en al menos nueve grupos: (1) derivados de ácido salicílico; (2) derivados de ácido propiónico; (3) derivados de ácido acético; (4) derivados de ácido fenámico; (5) derivados de ácido carboxílico; (6) derivados de ácido butírico; (7) oxicams; (8) pirazoles y (9) pirazonas.

En otra realización específica, la presente descripción se refiere al uso de un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 en combinación (tratamiento previo, tratamiento posterior o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más derivados de ácido salicílico, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Tales derivados de ácido salicílico, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: acetaminosalol, aloxiprina, aspirina, benorilato, bromosaligenina, acetilsalicilato de calcio, trisalicilato de colina y magnesio, salicilato de magnesio, salicilato de colina, diflusal, etersalato, fendosal, ácido gentísico, salicilato de glicol, salicilato de imidazol, acetilsalicilato de lisina, mesalamina, salicilato de morfolina, salicilato de 1-naftilo, olsalazina, parsalmida,

acetilsalicilato de fenilo, salicilato de fenilo, salacetamida, ácido O-acético de salicilamida, salsalato, salicilato de sodio y sulfasalazina. También se pretende que derivados de ácido salicílico estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares estén abarcados por este grupo.

5 En una realización específica adicional, la presente descripción se refiere al uso de un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 en combinación (tratamiento previo, tratamiento posterior o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más derivados de ácido propiónico, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los derivados de ácido propiónico, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: alminoprofeno, benoxaprofeno, ácido buclóxico, carprofeno, dexindoprofeno, fenoprofeno, flunoxaprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, furciprofeno, 10 ibuprofeno, ibuprofeno aluminio, ibuproxam, indoprofeno, isoprofeno, ketoprofeno, loxoprofeno, miroprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, oxaprozina, piketoprofeno, pimeprofeno, piroprofeno, pranoprofeno, ácido protizínico, piridoxiprofeno, suprofeno, ácido tiaprofénico y tioxaprofeno. También se pretende que derivados de ácido propiónico estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares estén abarcados por este grupo.

15 Aún en otra realización específica, la presente descripción se refiere al uso de un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 en combinación (tratamiento previo, tratamiento posterior o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más derivados de ácido acético, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los derivados de ácido acético, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: acemetacina, alclofenaco, amfenaco, bufexamaco, cinmetacina, clopiraco, delmetacina, diclofenaco potásico, diclofenaco sódico, etodolaco, 20 felbinaco, fenclofenaco, fencloraco, ácido fenclozico, fentiazaco, furofenaco, glucametacina, ibufenaco, indometacina, isofezolaco, isoxepaco, lonazolaco, ácido etiazínico, oxametacina, oxpinaco, pimetacina, proglumetacina, sulindaco, talmetacina, tiaramida, tiopinaco, tolmetina, tolmetina sódica, zidometacina y zomepiraco. También se pretende que derivados de ácido acético estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares estén abarcados por este grupo.

En otra realización específica, la presente descripción se refiere al uso de un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 en combinación (tratamiento previo, tratamiento posterior o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más derivados de ácido fenámico, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los derivados de ácido fenámico, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: ácido enfenámico, etofenamato, 30 ácido flufenámico, isonixina, ácido meclofenámico, meclofenamato sódico, ácido medofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico, talniflumato, terofenamato, ácido tolfenámico y ufenamato. También se pretende que derivados de ácido fenámico estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares estén abarcados por este grupo.

35 En una realización específica adicional, la presente descripción se refiere al uso de un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 en combinación (tratamiento previo, tratamiento posterior o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más derivados de ácido carboxílico, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los derivados de ácido carboxílico, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos que pueden usarse comprenden: clidanaco, diflunisal, flufenisal, inoridina, ketorolaco y tinoridina. También se pretende que derivados de ácido carboxílico estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares estén abarcados por este grupo.

45 Aún en otra realización específica, la presente descripción se refiere al uso de un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 en combinación (tratamiento previo, tratamiento posterior o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más derivados de ácido butírico, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los derivados de ácido butírico, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: bumadizona, butibufeno, fenbufeno y xenbucina. También se pretende que derivados de ácido butírico estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares estén abarcados por este grupo.

50 En otra realización específica, la presente descripción se refiere al uso de un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 en combinación (tratamiento previo, tratamiento posterior o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más oxicams, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los oxicams, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: droxicam, enolicam, isoxicam, piroxicam, sudoxicam, tenoxicam y 4-hidroxi- 55 1,2-benzotiazina-1,1-dióxido-4-(N-fenil)-carboxamida. También se pretende que oxicams estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares estén abarcados por este grupo.

Todavía en otra realización específica, la presente descripción se refiere al uso de un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 en combinación (tratamiento previo, tratamiento posterior o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más pirazoles, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los pirazoles, ésteres de profármacos y sales 60

farmacéuticamente aceptables de los mismos que pueden usarse comprenden: difenamizol y epirizol. También se pretende que pirazoles estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares estén abarcados por este grupo.

5 En una realización específica adicional, la presente descripción se refiere al uso de un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 en combinación (tratamiento previo, tratamiento posterior o tratamiento simultáneo) con cualquiera de una o más pirazonas, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Las pirazonas, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos que pueden usarse comprenden: apazona, azapropazona, benzpiperilona, feprazona, mofebutazona, morazona, oxifenbutazona, fenilbutazona, pipebuzona, propilfenazona, ramifenazona, suxibuzona y tiazolinobutazona. También se pretende que pirazonas estructuralmente relacionadas que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares estén abarcados por este grupo.

15 En otra realización específica, la presente descripción se refiere al uso de un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 en combinación (tratamiento previo, tratamiento posterior o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más de los siguientes AINE: ácido ϵ -acetamidocaproico, S-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxi-butírico, amixetrina, anitrazafeno, antrafenina, bendazaco, lisinato de bendazaco, bencidamina, beprozina, broperamol, bucolomo, bufezolaco, ciprocuzona, cloximato, dazidamina, deboxamet, detomidina, difenpiramida, difenpiramida, difisalamina, ditazol, emorfazona, mesilato de fanetizol, fenflumizol, floctafenina, flumizol, flunixina, fluprocuazona, fopirtolina, fosfosal, guaimesal, guaiazoleno, isonixina, lefetamina HCl, leflunomida, lofemizol, lotifazol, clonixinato de lisina, meseclazona, nabumetona, nictindol, nimesulida, orgoteína, orpanoxina, oxaceprol, oxapadol, paranilina, perisoxal, citrato de perisoxal, pifoxima, piroxeno, pirazolaco, pifendona, procuazona, proxazol, tielavina B, tiflamizol, timegadina, tolectina, tolpadol, triptamida y los designados por el número de código de compañías tal como 480156S, AA861, AD1590, AFP802, AFP860, AI77B, AP504, AU8001, BPPC, BW540C, CHINOIN 127, CN100, EB382, EL508, F1044, FK-506, GV3658, ITF182, KCNTEI6090, KME4, LA2851, MR714, MR897, MY309, ON03144, PR823, PV102, PV108, R830, RS2131, SCR152, SH440, SIR133, SPAS510, SQ27239, ST281, SY6001, TA60, TAI-901 (ácido 4-benzoil-1-indancarboxílico), TVX2706, U60257, UR2301 y WY41770. También se pretende que AINE estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares a los AINE estén abarcados por este grupo.

30 Todavía en otra realización específica, la presente descripción se refiere al uso de un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 en combinación (tratamiento previo, tratamiento posterior o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más corticosteroides, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de las enfermedades y trastornos mencionados en el presente documento, incluyendo inflamación aguda y crónica tal como enfermedades reumáticas, enfermedad de injerto contra huésped y esclerosis múltiple. Los corticosteroides, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen hidrocortisona y compuestos que se derivan de hidrocortisona, tales como 21-acetoxipregnenolona, alclomerasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, valerato de betametasona, budesonida, cloroprednisona, clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, butirato de clobetasona, clocortolona, cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximerasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluzacort, flucoronida, flumetasona, pivalato de flumetasona, acetónido de flucinolona, flunisolida, fluocinonida, acetónido de fluorocinolona, fluocortina butilo, fluocortolona, hexanoato de fluocortolona, valerato de diflucortolona, fluorometolona, acetato de fluperolona, acetato de fluprednideno, fluprednisolona, flurandenedolida, formocortal, halcinonida, halometasona, acetato de halopredona, hidrocortamato, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, fosfato de hidrocortisona, succinato 21-sódico de hidrocortisona, tebutato de hidrocortisona, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, furoato de mometasona, parametasona, prednicarbo, prednisolona, 21-diedriaminoacetato de prednisolona, fosfato sódico de prednisolona, succinato sódico de prednisolona, 21-m-sulfobenzoato sódico de prednisolona, 21-estearoglicolato sódico de prednisolona, tebutato de prednisolona, 21-trimetilacetato de prednisolona, prednisona, prednival, prednilideno, 21-dietilaminoacetato de prednilideno, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, benetonido de triamcinolona y hexacetónido de triamcinolona. También se pretende que corticosteroides estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares estén abarcados por este grupo.

55 En otra realización específica, la presente descripción se refiere al uso de un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 en combinación (tratamiento previo, tratamiento posterior o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más fármacos antirreumáticos de acción lenta (FARAL) o fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME), ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de las enfermedades y trastornos mencionados en el presente documento, incluyendo inflamación aguda y crónica tal como enfermedades reumáticas, enfermedad de injerto contra huésped y esclerosis múltiple. Los FARAL o FARME, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: alocupreida sódica, auranofina, aurotioglucosa, aurotioglicanida, azatioprina, brequinar sódico, bucilamina, 3-aurotio-2-propanol-1-sulfonato de calcio, clorambucilo, cloroquina, clobuzarit, cuproxolina, ciclofosfamida, ciclosporina, dapsona, 15-desoxiespergualina, diacereína, glucosamina, sales de oro (por ejemplo, sal de oro de cicloquina, tiomato sódico de oro, tiosulfato sódico de oro),

5 hidroxicloroquina, sulfato de hidroxicloroquina, hidroxiiurea, kebusona, levamisol, lobenzarit, melitina, 6-mercaptapurina, metotrexato, mizoribina, micofenolato de mofetilo, mioral, mostaza de nitrógeno, D-penicilamina, piridinolimidazoles tales como SKNF86002 y SB203580, rapamicina, tioles, timopoyetina y vincristina. También se pretende que FARAL o FARME estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares estén abarcados por este grupo.

10 En otra realización específica, la presente descripción se refiere al uso de un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 en combinación (tratamiento previo, tratamiento posterior o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más inhibidores de COX2, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de las enfermedades y trastornos mencionados en el presente documento, incluyendo inflamación aguda y crónica. Los ejemplos de inhibidores de COX2, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen, por ejemplo, celecoxib. También se pretende que inhibidores de COX2 estructuralmente relacionados que tienen propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares estén abarcados por este grupo.

15 Todavía en otra realización específica, la presente descripción se refiere al uso de un agonista o antagonista del polipéptido similar a IL-17, y/o un receptor de polipéptido similar a IL-17 en combinación (tratamiento previo, tratamiento posterior o tratamiento simultáneo) con cualquiera de uno o más antimicrobianos, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de las enfermedades y trastornos mencionados en el presente documento, incluyendo inflamación aguda y crónica. Los antimicrobianos incluyen, por ejemplo, las amplias clases de penicilinas, cefalosporinas y otras beta-lactamas, aminoglicósidos, azoles, quinolonas, macrólidos, rifamicinas, tetraciclinas, sulfonamidas, lincosamidas y polimixinas. Las penicilinas incluyen, pero no se limitan a penicilina G, penicilina V, meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, floxacilina, ampicilina, ampicilina/sulbactam, amoxicilina, amoxicilina/clavulanato, hetacilina, ciclacilina, bacampicilina, carbenicilina, carbenicilina indanilo, ticarcilina, ticarcilina/clavulanato, azlocilina, mezlocilina, peperacilina y mecilina. Las cefalosporinas y otras beta-lactamas incluyen, pero no se limitan a cefalotina, cefapirina, cefalexina, cefradina, cefazolina, cefadroxilo, cefaclor, cefamandol, cefotetán, cefoxitina, cefuroxima, cefonicid, ceforadina, cefixima, cefotaxima, moxalactama, ceftizoxima, cetriaxona, cefoperazona, ceftazidima, imipenem y aztreonam. Los aminoglicósidos incluyen, pero no se limitan a estreptomina, gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina, kanamicina y neomicina. Los azoles incluyen, pero no se limitan a fluconazol. Las quinolonas incluyen, pero no se limitan a ácido nalidíxico, norfloxacin, enoxacin, ciprofloxacino, ofloxacino, esparfloxacino y temafloxacino. Los macrólidos incluyen, pero no se limitan a eritromicina, espiramicina y azitromicina. Las rifamicinas incluyen, pero no se limitan a rifampina. Las tetraciclinas incluyen, pero no se limitan a espiciclina, clortetraciclina, clomociclina, demeclociclina, desoxiciclina, guameciclina, limeciclina, meclociclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina, penimepiciclina, pipaciclina, rolitetraciclina, sanciclina, senociclina y tetraciclina. Las sulfonamidas incluyen, pero no se limitan a sulfanilamida, sulfametoxazol, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfisoxazol y cotrimoxazol (trimetoprim/sulfametoxazol). Las lincosamidas incluyen, pero no se limitan a clindamicina y lincomicina. Las polimixinas (polipéptidos) incluyen, pero no se limitan a polimixina B y colistina.

Composiciones de polipéptido similar a IL-17 y administración

40 Están dentro del alcance de la presente descripción composiciones terapéuticas. Tales composiciones farmacéuticas de polipéptido similar a IL-17 pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido similar a IL-17 o una molécula de ácido nucleico de polipéptido similar a IL-17 en mezcla con un agente de formulación farmacéutica o fisiológicamente aceptable para idoneidad con el modo de administración. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes de unión selectiva a polipéptido similar a IL-17 en mezcla con un agente de formulación farmacéutica o fisiológicamente aceptable para idoneidad con el modo de administración.

45 Los materiales de formulación aceptables son preferiblemente no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas.

50 La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes de carga (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, aromatizantes y de dilución; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como Pluronic, PEG, ésteres de sorbitano, polisorbatos

tales como polisorbato 20, polisorbato 80, tritón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (tal como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1990).

La composición farmacéutica óptima la determinará un experto en la técnica dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración prevista, el formato de administración y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, citado anteriormente. Tales composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de aclaramiento *in vivo* de la molécula de polipéptido similar a IL-17.

El vehículo o portador primario en una composición farmacéutica puede ser de naturaleza o bien acuosa o bien no acuosa. Por ejemplo, un vehículo o portador adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica líquido cefalorraquídeo artificial, posiblemente complementado con otros materiales comunes en composiciones para administración parenteral. Solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina sérica son vehículos a modo de ejemplo adicionales. Otras composiciones farmacéuticas a modo de ejemplo comprenden tampón Tris de aproximadamente pH 7,0-8,5, o tampón acetato de aproximadamente pH 4,0-5,5, que puede incluir además sorbitol o un sustituto adecuado para el mismo. En una realización de la presente invención, pueden prepararse composiciones de polipéptido similar a IL-17 para su almacenamiento mezclando la composición seleccionada que tiene el grado de pureza deseado con agentes de formulación opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, citado anteriormente) en forma de una torta liofilizada o una disolución acuosa. Además, el producto de polipéptido similar a IL-17 puede formularse como un producto liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

Las composiciones farmacéuticas de polipéptido similar a IL-17 pueden seleccionarse para administración parenteral. Alternativamente, las composiciones pueden seleccionarse para inhalación o para administración a través del tubo digestivo, tal como por vía oral. La preparación de tales composiciones farmacéuticamente aceptables está dentro del conocimiento de la técnica.

Los componentes de formulación están presentes en concentraciones que son aceptables para el sitio de administración. Por ejemplo, se usan tampones para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, normalmente dentro de un intervalo de pH de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 8.

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para su uso en esta invención pueden estar en forma de una disolución acuosa aceptable por vía parenteral, libre de pirógenos que comprende la molécula de polipéptido similar a IL-17 deseada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para inyección parenteral es agua destilada estéril en la que se formula una molécula de polipéptido similar a IL-17 como una disolución isotónica, estéril, apropiadamente conservada. Aún otra preparación puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como poli(ácido láctico) o poli(ácido glicólico)), perlas o liposomas, que proporciona la liberación controlada o sostenida del producto que puede administrarse entonces mediante una inyección de depósito. También puede usarse ácido hialurónico, y éste puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. Otros medios adecuados para la introducción de la molécula deseada incluyen dispositivos de administración de fármacos implantables.

En una realización, puede formularse una composición farmacéutica para inhalación. Por ejemplo, puede formularse una molécula de polipéptido similar a IL-17 como un polvo seco para inhalación. También pueden formularse disoluciones de inhalación de polipéptido similar a IL-17 o molécula de ácido nucleico de polipéptido similar a IL-17 con un propelente para administración en aerosol. Aún en otra realización, pueden nebulizarse disoluciones. Se describe adicionalmente la administración pulmonar en la solicitud PCT n.º PCT/US94/001875, que describe la administración pulmonar de proteínas químicamente modificadas.

También se contempla que determinadas formulaciones puedan administrarse por vía oral. En una realización de la presente invención, pueden formularse moléculas de polipéptido similar a IL-17 que se administran de este modo con o sin los portadores usados habitualmente en la composición de formas farmacéuticas sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, puede diseñarse una cápsula para que libere la parte activa de la formulación en el punto en el tracto gastrointestinal en el que se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción de la molécula de polipéptido similar a IL-17. También pueden emplearse diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes de disgregación de comprimidos y aglutinantes.

Otra composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de moléculas de polipéptido similar a IL-17 en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Disolviendo los comprimidos en agua estéril, u otro vehículo apropiado, pueden prepararse disoluciones en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio o bicarbonato, lactosa o fosfato de calcio; o agentes de unión, tales como almidón, gelatina o

goma arábica; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

Resultarán evidentes composiciones farmacéuticas de polipéptido similar a IL-17 adicionales para los expertos en la técnica, incluyendo formulaciones que implican polipéptidos similares a IL-17 en formulaciones de administración sostenida o controlada. Los expertos en la técnica también conocen técnicas para formular una variedad de otros medios de administración sostenida o controlada, tales como portadores de liposomas, micropartículas bioerosionables o perlas porosas e inyecciones de depósito. Véase por ejemplo, la solicitud PCT n.º PCT/US93/00829 que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. Los ejemplos adicionales de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida pueden incluir poliésteres, hidrogeles, polilactidas (patente estadounidense n.º 3.773.919 y documento EP 058.481), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de gamma-etilo (Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22:547-556 (1983)), poli(metacrilato de 2-hidroxi-etilo) (Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277 (1981) y Langer, *Chem. Tech.*, 12:98-105 (1982)), acetato de etilvinilo (Langer *et al.*, citado anteriormente) o poli(ácido D(-)-3-hidroxi-butírico) (documento EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida pueden incluir también liposomas, que pueden prepararse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, Eppstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-3692 (1985); documentos EP 036.676; EP 088.046 y EP 143.949.

La composición farmacéutica de polipéptido similar a IL-17 que va a usarse para administración *in vivo* normalmente debe ser estéril. Esto puede lograrse mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición está liofilizada, la esterilización usando este método puede realizarse o bien antes de o bien tras la liofilización y reconstitución. La composición para administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en una disolución. Además, las composiciones parenterales se colocan generalmente en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, un vial o bolsa de disolución intravenosa que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

Una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, puede almacenarse en viales estériles como una disolución, suspensión, gel, emulsión, sólido o como un polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones pueden almacenarse o bien en una forma lista para usar o bien en una forma (por ejemplo, liofilizada) que requiere reconstitución antes de su administración.

En una realización específica, la presente descripción se refiere a kits para producir una unidad de administración de dosis individual. Los kits pueden contener cada uno tanto un primer recipiente que tiene una proteína secada como un segundo recipiente que tiene una formulación acuosa. También se incluyen dentro del alcance de esta invención kits que contienen jeringas precargadas de una única y de múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas de líquido y liojeringas).

La cantidad eficaz de una composición farmacéutica de polipéptido similar a IL-17 que va a emplearse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto terapéutico y los objetivos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán por tanto dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la que está usándose la molécula de polipéptido similar a IL-17, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño de órgano) y estado (la edad y salud general) del paciente. Por consiguiente, el médico puede titular la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede oscilar entre aproximadamente 0,1 µg/kg y hasta aproximadamente 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En otras realizaciones, la dosificación puede oscilar entre 0,1 µg/kg y hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 1 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 5 µg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg.

La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la molécula de polipéptido similar a IL-17 en la formulación usada. Normalmente, un médico administrará la composición hasta que se alcanza una dosificación que logra el efecto deseado. La composición puede administrarse por tanto como una única dosis, o como dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de la molécula deseada) a lo largo del tiempo, o como una infusión continua mediante un catéter o dispositivo de implante. Los expertos habituales en la técnica realizan rutinariamente un refinamiento adicional de la dosificación apropiada y está dentro del ámbito de las tareas realizadas rutinariamente por los mismos. Pueden determinarse dosificaciones apropiadas a través del uso de datos de respuesta a la dosis apropiados.

La vía de administración de la composición farmacéutica concuerda con métodos conocidos, por ejemplo, por vía oral, a través de inyección mediante las vías intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal o intralesional; mediante sistemas de liberación sostenida o mediante dispositivos de implante. Cuando se desee, las composiciones pueden administrarse mediante inyección en bolo o de manera continua mediante infusión, o mediante un dispositivo de implante.

Alternativa o adicionalmente, la composición puede administrarse localmente mediante el implante de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que se ha absorbido o encapsulado la molécula deseada.

Cuando se usa un dispositivo de implante, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de la molécula deseada puede ser mediante difusión, bolo de liberación temporal o administración continua.

5 En algunos casos, puede ser deseable usar composiciones farmacéuticas de polipéptido similar a IL-17 de una manera *ex vivo*. En tales casos, las células, los tejidos o los órganos que se han extraído del paciente se exponen a composiciones farmacéuticas de polipéptido similar a IL-17 tras lo cual las células, los tejidos y/o los órganos se implantan posteriormente de nuevo en el paciente.

10 En otros casos, puede administrarse un polipéptido similar a IL-17 implantando determinadas células que se han modificado por ingeniería genética, usando métodos tales como los descritos en el presente documento, para expresar y secretar el polipéptido. Tales células pueden ser células animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas o xenogénicas. Opcionalmente, las células pueden inmortalizarse. Con el fin de disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, las células pueden encapsularse para evitar la infiltración de tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son normalmente membranas o envolturas poliméricas semipermeables, biocompatibles que permiten la liberación del/de los producto(s) proteico(s) pero impiden la destrucción de las
15 células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos circundantes.

Realizaciones adicionales de la presente descripción se refieren a células y métodos (por ejemplo, recombinación homóloga y/u otros métodos de producción recombinante) para tanto la producción *in vitro* de polipéptidos terapéuticos como para la producción y administración de polipéptidos terapéuticos mediante terapia génica o terapia celular. Pueden usarse recombinación homóloga y otros métodos de recombinación para modificar una
20 célula que contiene un gen de polipéptido similar a IL-17 silencioso transcripcionalmente, o un gen subexpresado, y de ese modo producir una célula que expresa cantidades terapéuticamente eficaces de polipéptidos similares a IL-17.

La recombinación homóloga es una técnica originalmente desarrollada para seleccionar como diana genes para inducir o corregir mutaciones en genes activos transcripcionalmente (Kucherlapati, Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol., 36:301 (1989)). La técnica básica se desarrolló como un método para introducir mutaciones específicas en regiones específicas del genoma de mamíferos (Thomas *et al.*, Cell, 44:419-428 (1986); Thomas y Capecchi, Cell, 51:503-512 (1987); Doetschman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 85:8583-8587 (1988)) o para corregir mutaciones específicas dentro de genes defectuosos (Doetschman *et al.*, Nature, 330:576-578 (1987)). Se describen técnicas de recombinación homóloga a modo de ejemplo en la patente estadounidense n.º 5.272.071 (documento EP 9193051, publicación EP n.º 505500 y documento PCT/US90/07642, publicación internacional n.º WO 91/09955).
25 30

A través de recombinación homóloga, la secuencia de ADN que va a insertarse en el genoma puede dirigirse a una región específica del gen de interés uniéndola a ADN de direccionamiento. El ADN de direccionamiento es una secuencia de nucleótidos que es complementaria (homóloga) a una región del ADN genómico. Se ponen en contacto pequeños trozos de ADN de direccionamiento que son complementarios a una región específica del
35 genoma con la hebra original durante el proceso de replicación del ADN. Es una propiedad general del ADN que se ha insertado en una célula que se hibride y, por tanto, se recombine con otros trozos de ADN endógeno a través de regiones homólogas compartidas. Si esta hebra complementaria se une a un oligonucleótido que contiene una mutación o una secuencia diferente o un nucleótido adicional, se incorpora también en la hebra recién sintetizada como resultado de la recombinación. Como resultado de la función de corrección de lectura, es posible que la nueva
40 secuencia de ADN sirva como molde. Por tanto, el ADN transferido se incorpora en el genoma.

Unidas a estos trozos de ADN de direccionamiento hay regiones de ADN que pueden interactuar con o controlar la expresión de un polipéptido similar a IL-17, por ejemplo, secuencias flanqueantes. Por ejemplo, se inserta un elemento promotor/potenciador, un supresor o un elemento modulador de la transcripción exógeno en el genoma de la célula huésped prevista en proximidad y orientación suficientes para influir en la transcripción de ADN que codifica para el polipéptido similar a IL-17 deseado. El elemento de control controla una parte del ADN presente en el genoma de la célula huésped. Por tanto, puede lograrse la expresión del polipéptido similar a IL-17 deseado no mediante transfección de ADN que codifica para el propio gen de polipéptido similar a IL-17, sino más bien mediante el uso de ADN de direccionamiento (que contiene regiones de homología con el gen endógeno de interés), acoplado con segmentos reguladores de ADN que proporcionan a la secuencia génica endógena señales reconocibles para la transcripción de un gen de polipéptido similar a IL-17.
45 50

En un método a modo de ejemplo, la expresión de un gen seleccionado como diana deseado en una célula (es decir, un gen celular endógeno deseado) se altera mediante recombinación homóloga en el genoma celular en un sitio preseleccionado mediante la introducción de ADN que incluye al menos una secuencia reguladora, un exón y un sitio donador de corte y empalme. Estos componentes se introducen en el ADN cromosómico (genómico) de una manera tal que esto, en efecto, da como resultado la producción de una nueva unidad de transcripción (en la que la secuencia reguladora, el exón y el sitio donador de corte y empalme presentes en el constructo de ADN están operativamente unidos al gen endógeno). Como resultado de la introducción de estos componentes en el ADN cromosómico, se altera la expresión del gen endógeno deseado.
55

La expresión génica alterada, tal como se describe en el presente documento, abarca activar (o hacer que se

expresen) un gen que normalmente es silencioso (no se expresa) en la célula tal como se obtiene, así como aumentar la expresión de un gen que no se expresa a niveles fisiológicamente significativos en la célula tal como se obtiene. Las realizaciones abarcan además cambiar el patrón de regulación o inducción de manera que sea diferente del patrón de regulación o inducción que se produce en la célula tal como se obtiene, y reducir (incluyendo eliminar) la expresión de un gen que se expresa en la célula tal como se obtiene.

Un método mediante el que puede usarse recombinación homóloga para aumentar, o provocar, la producción de polipéptido similar a IL-17 a partir del gen de polipéptido de similar IL-17 endógeno de una célula implica usar en primer lugar recombinación homóloga para colocar una secuencia de recombinación a partir de un sistema de recombinación específico de sitio (por ejemplo, Cre/loxP, FLP/FRT) (véase, Sauer, Current Opinion In Biotechnology, 5:521-527 (1994) y Sauer, Methods In Enzymology, 225:890-900 (1993)) en el sentido de 5' de (es decir, en 5' con respecto a) la región que codifica para polipéptido similar a IL-17 genómica endógena. Se introdujo un plásmido que contenía un sitio de recombinación homólogo para el sitio que se colocó justo en el sentido de 5' de la región que codifica para polipéptido similar a IL-17 genómica en la línea celular modificada junto con la enzima recombinasa apropiada. Esta enzima recombinasa hace que el plásmido se integre, mediante el sitio de recombinación del plásmido, en el sitio de recombinación ubicado justo en el sentido de 5' de la región que codifica para polipéptido similar a IL-17 genómica en la línea celular (Baubonis y Sauer, Nucleic Acids Res., 21:2025-2029, 1993 y O'Gorman *et al.*, Science, 251:1351-1355 (1991)). Cualquier secuencia flanqueante que se sepa que aumenta la transcripción (por ejemplo, potenciador/promotor, intrón o potenciador de la traducción), si se sitúa apropiadamente en este plásmido, se integraría de una manera tal que se crea una unidad transcripcional nueva o modificada, dando como resultado una producción de polipéptido similar a IL-17 *de novo* o aumentada a partir del gen de polipéptido similar a IL-17 endógeno de la célula.

Un método adicional para usar la línea celular en la que se ha colocado la secuencia de recombinación específica de sitio justo en el sentido de 5' de la región que codifica para polipéptido similar a IL-17 genómica endógena es usar recombinación homóloga para introducir un segundo sitio de recombinación en otra parte en el genoma de la línea celular. Entonces se introduce la enzima recombinasa apropiada en la línea celular con dos sitios de recombinación, provocando un acontecimiento de recombinación (deleción, inversión o translocación) (Sauer, Current Opinion In Biotechnology, citado anteriormente (1994) y Sauer, Methods in Enzymology, citado anteriormente, (1993)) que crearía una unidad transcripcional nueva o modificada dando como resultado una producción de polipéptido similar a IL-17 *de novo* o aumentada a partir del gen de polipéptido similar a IL-17 endógeno de la célula.

Un enfoque adicional para aumentar, o provocar, la expresión de polipéptido similar a IL-17 a partir del gen de polipéptido similar a IL-17 endógeno de una célula implica aumentar, o provocar, la expresión de un gen o genes (por ejemplo, factores de transcripción) y/o disminuir la expresión de un gen o genes (por ejemplo, represores transcripcionales) de una manera que da como resultado la producción de polipéptido similar a IL-17 *de novo* o aumentada a partir del gen de polipéptido similar a IL-17 endógeno de la célula. Este método incluye la introducción de un polipéptido que no se produce de manera natural (por ejemplo, un polipéptido que comprende un dominio de unión a ADN específico de sitio fusionado a un dominio de factor transcripcional) en la célula de manera que resulta una producción polipéptido similar a IL-17 *de novo* o aumentada a partir del gen de polipéptido similar a IL-17 endógeno de la célula.

La presente descripción se refiere además a constructos de ADN útiles en el método de alteración de la expresión de un gen diana. En determinadas realizaciones, los constructos de ADN a modo de ejemplo comprenden: (a) una o más secuencias de direccionamiento; (b) una secuencia reguladora; (c) un exón y (d) un sitio donador de corte y empalme desapareado. La secuencia de direccionamiento en el constructo de ADN dirige la integración de los elementos (a) - (d) en un gen diana en una célula de manera que los elementos (b) - (d) se unen operativamente a secuencias del gen diana endógeno. En otra realización, los constructos de ADN comprenden: (a) una o más secuencias de direccionamiento, (b) una secuencia reguladora, (c) un exón, (d) un sitio donador de corte y empalme, (e) un intrón y (f) un sitio aceptor de corte y empalme, dirigiendo la secuencia de direccionamiento la integración de los elementos (a) - (f) de manera que los elementos de (b) - (f) se unen operativamente al gen endógeno. La secuencia de direccionamiento es homóloga para el sitio preseleccionado en el ADN cromosómico celular con el que va a producirse la recombinación homóloga. En el constructo, el exón está generalmente en 3' de la secuencia reguladora y el sitio donador de corte y empalme está en 3' del exón.

Si se conoce la secuencia de un gen particular, tal como la secuencia de ácido nucleico de polipéptido similar a IL-17 presentada en el presente documento, puede sintetizarse un trozo de ADN que es complementario a una región seleccionada del gen u obtenerse de otra forma, tal como mediante restricción apropiada del ADN nativo en sitios de reconocimiento específicos que delimitan la región de interés. Este trozo sirve como secuencia(s) de direccionamiento tras su inserción en la célula y se hibridará con su región homóloga dentro del genoma. Si esta hibridación se produce durante la replicación del ADN, este trozo de ADN, y cualquier secuencia adicional unida al mismo, actuará como fragmento de Okazaki y se incorporará en la hebra de ADN hija recién sintetizada. La presente descripción, por tanto, incluye nucleótidos que codifican para un polipéptido similar a IL-17, nucleótidos que pueden usarse como secuencias de direccionamiento.

También se contempla terapia celular de polipéptido similar a IL-17, por ejemplo, la implantación de células que producen polipéptidos similares a IL-17. Esta realización implica implantar células que pueden sintetizar y secretar

una forma biológicamente activa de polipéptido similar a IL-17. Tales células que producen polipéptido similar a IL-17 pueden ser células que son productores naturales de polipéptidos similares a IL-17 o pueden ser células recombinantes cuya capacidad para producir polipéptidos similares a IL-17 se ha aumentado mediante transformación con un gen que codifica para el polipéptido similar a IL-17 deseado o con un gen que aumenta la expresión de polipéptido similar a IL-17. Puede lograrse una modificación de este tipo por medio de un vector adecuado para suministrar el gen así como promover su expresión y secreción. Con el fin de minimizar una posible reacción inmunológica en pacientes a los que se les está administrando un polipéptido similar a IL-17, tal como puede producirse con la administración de un polipéptido de una especie foránea, se prefiere que las células naturales que producen polipéptido similar a IL-17 sean de origen humano y produzcan polipéptido similar a IL-17 humana. Asimismo, se prefiere que las células recombinantes que producen polipéptido similar a IL-17 estén transformadas con un vector de expresión que contiene un gen que codifica para un polipéptido similar a IL-17 humana.

Pueden encapsularse las células implantadas para evitar la infiltración del tejido circundante. Pueden implantarse células animales humanas o no humanas en membranas o envolturas semipermeables, biocompatibles que permiten la liberación de polipéptido similar a IL-17 pero que impiden la destrucción de las células por el sistema inmunitario del paciente o por otros factores perjudiciales del tejido circundante. Alternativamente, las propias células del paciente, transformadas para producir polipéptidos similares a IL-17 *ex vivo*, pueden implantarse directamente en el paciente sin tal encapsulación.

En la técnica se conocen técnicas para la encapsulación de células vivas, y puede lograrse rutinariamente la preparación de las células encapsuladas y su implantación en pacientes. Por ejemplo, Baetge *et al.* (documentos WO 95/05452 y PCT/US94/09299) describen cápsulas de membrana que contienen células modificadas por ingeniería genética para la administración eficaz de moléculas biológicamente activas. Las cápsulas son biocompatibles y pueden recuperarse fácilmente. Las cápsulas encapsulan células transfectadas con moléculas de ADN recombinante que comprenden secuencias de ADN que codifican para moléculas biológicamente activas operativamente unidas a promotores que no se someten a regulación por disminución *in vivo* tras su implantación en un huésped mamífero. Los dispositivos proporcionan la administración de las moléculas a partir de células vivas a sitios específicos dentro de un receptor. Además, véanse las patentes estadounidenses n.ºs 4.892.538, 5.011.472 y 5.106.627. Se describe un sistema para la encapsulación de células vivas en la solicitud PCT n.º PCT/US91/00157 de Aebischer *et al.* Véanse también la solicitud PCT n.º PCT/US91/00155 de Aebischer *et al.*; Winn *et al.*, *Exper. Neurol.*, 113:322-329 (1991), Aebischer *et al.*, *Exper. Neurol.*, 111:269-275 (1991); y Tresco *et al.*, *ASAIO*, 38:17-23 (1992).

También se prevé el suministro de terapia génica *in vivo* e *in vitro* de polipéptidos similares a IL-17. Un ejemplo de una técnica de terapia génica es usar el gen de polipéptido similar a IL-17 (o bien ADN genómico, ADNc y/o bien ADN sintético) que codifica para un polipéptido similar a IL-17 que puede estar operativamente unido a un promotor constitutivo o inducible para formar un "constructo de ADN de terapia génica". El promotor puede ser homólogo o heterólogo para el gen de polipéptido similar a IL-17 endógeno, siempre que sea activo en la célula o tipo de célula en el que se insertará el constructo. Otros componentes del constructo de ADN de terapia génica pueden incluir opcionalmente moléculas de ADN diseñadas para integración específica de sitio (por ejemplo, secuencias endógenas útiles para recombinación homóloga); promotor, potenciador(es) o silenciador(es) específico(s) de tejido; moléculas de ADN que pueden proporcionar una ventaja selectiva con respecto a la célula antecesora; moléculas de ADN útiles como marcadores para identificar células transformadas; sistemas de selección negativa; agentes de unión específicos de célula (como, por ejemplo, para direccionamiento celular); factores de internalización específicos de célula; y factores de transcripción para potenciar la expresión por un vector, así como factores para permitir la fabricación del vector.

Entonces, puede introducirse un constructo de ADN de terapia génica en células (o bien *ex vivo* o bien *in vivo*) usando vectores virales o no virales. Un medio para introducir el constructo de ADN de terapia génica es por medio de vectores virales tal como se describe en el presente documento. Determinados vectores, tales como vectores retrovirales, suministrarán el constructo de ADN al ADN cromosómico de las células, y el gen puede integrarse en el ADN cromosómico. Otros vectores funcionarán como episomas, y el constructo de ADN de terapia génica permanecerá en el citoplasma.

Aún en otras realizaciones, pueden incluirse elementos reguladores para la expresión controlada del gen de polipéptido similar a IL-17 en la célula diana. Tales elementos se activan en respuesta a un efector apropiado. De este modo, puede expresarse un polipéptido terapéutico cuando se desee. Un medio de control convencional implica el uso de dimerizadores o rapálogos de molécula pequeña (tal como se describe en los documentos WO 9641865 (documento PCT/US96/099486); WO 9731898 (documento PCT/US97/03137) y WO 9731899 (documento PCT/US95/03157)) usados para dimerizar proteínas quiméricas que contienen un dominio de unión de molécula pequeña y un dominio que puede iniciar un proceso biológico, tales como una proteína de unión a ADN o una proteína de activación transcripcional. La dimerización de las proteínas puede usarse para iniciar la transcripción del transgén.

Una tecnología de regulación alternativa usa un método de almacenamiento de proteínas expresadas a partir del gen de interés dentro de la célula como un agregado o una agrupación. El gen de interés se expresa como una

5 proteína de fusión que incluye un dominio de agregación condicional que da como resultado la retención de la proteína agregada en el retículo endoplasmático. Las proteínas almacenadas son estables e inactivas dentro de la célula. Sin embargo, las proteínas pueden liberarse administrando un fármaco (por ejemplo, ligando de molécula pequeña) que elimina el dominio de agregación condicional y de ese modo separa específicamente los agregados o las agrupaciones de modo que las proteínas pueden secretarse de la célula. Véase Science 287:816-817 y 826-830 (2000).

10 Otros interruptores génicos o medios de control adecuados incluyen, pero no se limitan a, los siguientes sistemas. Se usa mifepristona (RU486) como antagonista de progesterona. La unión de un dominio de unión a ligando del receptor de progesterona al antagonista de progesterona activa la transcripción formando un dímero de dos factores de transcripción que entonces pasan al núcleo para unirse al ADN. El dominio de unión a ligando se modifica para eliminar la capacidad del receptor para unirse al ligando natural. El sistema de receptor de hormona esteroide se describe adicionalmente en los documentos U.S. 5.364.91; WO 9640911 y WO 9710337.

15 Aún otro sistema de control usa ecdisona (una hormona esteroide de la mosca de la fruta) que se une a y activa un receptor de ecdisona (receptor citoplasmático). El receptor se transloca entonces al núcleo uniéndose a un elemento de respuesta de ADN específico (promotor del gen sensible a ecdisona). El receptor de ecdisona incluye un dominio de transactivación/dominio de unión a ADN/dominio de unión a ligando para iniciar la transcripción. El sistema de ecdisona se describe adicionalmente en los documentos U.S. 5.514.578; WO 9738117; WO 9637609 y WO9303162.

20 Otro medio de control usa un transactivador controlable por tetraciclina positivo. Este sistema implica un dominio de unión a ADN de proteína represora tet (cambios de aminoácidos R-4 de tet mutados que dan como resultado una proteína transactivadora regulada por tetraciclina inversa, es decir, se une a un operador tet en presencia de tetraciclina) unido a un polipéptido que activa la transcripción. Tales sistemas se describen en las patentes estadounidenses n.ºs 5.464.758; 5.650.298 y 5.654.168.

Se describen constructos de ácido nucleico y sistemas de control de la expresión adicionales en las patentes estadounidenses n.ºs 5.741.679 y 5.834.186, concedidas a Innovir Laboratories Inc.

25 Puede lograrse la terapia génica *in vivo* introduciendo el gen que codifica para un polipéptido similar a IL-17 en células mediante inyección local de una molécula de ácido nucleico de polipéptido similar a IL-17 o mediante otros vectores de suministro virales o no virales apropiados (Hefti, Neurobiology, 25:1418-1435 (1994)). Por ejemplo, puede contenerse una molécula de ácido nucleico que codifica para un polipéptido similar a IL-17 en un vector de virus adenoasociado (VAA) para su suministro a las células seleccionadas como diana (por ejemplo, Johnson, publicación internacional n.º WO 95/34670 y solicitud internacional n.º PCT/US95/07178). El genoma de VAA recombinante contiene normalmente repeticiones terminales invertidas de VAA que flanquean una secuencia de ADN que codifica para un polipéptido similar a IL-17 operativamente unido a secuencias de poliadenilación y promotoras funcionales.

35 Los vectores virales adecuados alternativos incluyen, pero no se limitan a, vectores de retrovirus, adenovirus, virus del herpes simple, lentivirus, virus de la hepatitis, parvovirus, papovavirus, virus de la viruela, alfavirus, coronavirus, rabdovirus, paramixovirus y virus del papiloma. La patente estadounidense n.º 5.672.344 describe un sistema de transferencia génica mediada por virus *in vivo* que implica un vector de VHS-1 neurotrófico recombinante. La patente estadounidense n.º 5.399.346 proporciona ejemplos de un procedimiento para proporcionar a un paciente una proteína terapéutica mediante la administración de células humanas que se han tratado *in vitro* para insertar un segmento de ADN que codifica para una proteína terapéutica. Se describen materiales y métodos adicionales para la puesta en práctica de técnicas de terapia génica en la patente estadounidense n.º 5.631.236 que implica vectores adenovirales; la patente estadounidense n.º 5.672.510 que implica vectores retrovirales; y el documento U.S. 5.635.399 que implica vectores retrovirales que expresan citocinas.

45 Los métodos de suministro no virales incluyen, pero no se limitan a, transferencia mediada por liposomas, suministro de ADN desnudo (inyección directa), transferencia mediada por receptor (complejo de ligando-ADN), electroporación, precipitación con fosfato de calcio y bombardeo con micropartículas (por ejemplo, pistola génica). Los materiales y métodos de terapia génica también pueden incluir el uso de promotores inducibles, promotores-potenciadores específicos de tejido, secuencias de ADN diseñadas para integración específica de sitio, secuencias de ADN que pueden proporcionar una ventaja selectiva con respecto a la célula antecesora, marcadores para identificar células transformadas, sistemas de selección negativa y sistemas de control de la expresión (medidas de seguridad), agentes de unión específicos de célula (para seleccionar como diana células), factores de internalización específicos de célula y factores de transcripción para potenciar la expresión por un vector así como métodos de fabricación del vector. Tales materiales y métodos adicionales para la puesta en práctica de técnicas de terapia génica se describen en la patente estadounidense n.º 4.970.154 que implica técnicas de electroporación; el documento WO96/40958 que implica ligandos nucleares; la patente estadounidense n.º 5.679.559 que describe un sistema que contiene lipoproteínas para el suministro de genes; la patente estadounidense n.º 5.676.954 que implica portadores de liposomas; la patente estadounidense n.º 5.593.875 referente a métodos para la transfección mediante fosfato de calcio; y la patente estadounidense n.º 4.945.050 en la que se propulsan partículas biológicamente activas a células a una velocidad mediante la cual las partículas penetran en la superficie de las células y se incorporan en el interior de las células.

También se contempla que la terapia celular o terapia génica de polipéptido similar a IL-17 pueda incluir además el suministro de uno o más polipéptidos adicionales en la(s) misma(s) o diferente(s) célula(s). Tales células pueden introducirse por separado en el paciente, o las células pueden contenerse en un único dispositivo implantable, tal como la membrana de encapsulación descrita anteriormente, o las células pueden modificarse por separado por medio de vectores virales.

Un medio para aumentar la expresión de un polipéptido similar a IL-17 endógeno en una célula mediante terapia génica es insertar uno o más elementos potenciadores en el promotor del polipéptido similar a IL-17, en el que el/los elemento(s) potenciador(es) puede(n) servir para aumentar la actividad transcripcional del gen de polipéptido similar a IL-17. El/los elemento(s) potenciador(es) usado(s) se seleccionará(n) basándose en el tejido en el que se desea activar el/los gen(es); se seleccionará(n) elemento(s) potenciador(es) que se sabe que confieren activación del promotor en ese tejido. Por ejemplo, si un gen que codifica para un polipéptido similar a IL-17 va a "activarse" en células T, puede usarse el elemento potenciador del promotor Ick. En este caso, la parte funcional del elemento transcripcional que va a añadirse puede insertarse en un fragmento de ADN que contiene el promotor del polipéptido similar a IL-17 (y opcionalmente, insertarse en un vector y/o secuencia(s) flanqueante(s) en 5' y/o 3', etc.) usando técnicas de clonación convencionales. Este constructo, conocido como "constructo de recombinación homóloga", puede introducirse entonces en las células deseadas o bien *ex vivo* o bien *in vivo*.

También puede usarse terapia génica para disminuir la expresión del polipéptido similar a IL-17 modificando la secuencia de nucleótidos del/de los promotor(es) endógeno(s). Tal modificación se logra normalmente mediante métodos de recombinación homóloga. Por ejemplo, puede modificarse por ingeniería genética una molécula de ADN que contiene todo o una parte del promotor del/de los gen(es) de polipéptido similar a IL-17 seleccionado para su inactivación para eliminar y/o reemplazar trozos del promotor que regulan la transcripción. Por ejemplo, puede deletionarse la caja TATA y/o el sitio de unión de un activador transcripcional del promotor usando técnicas de biología molecular convencionales; tal delección puede inhibir la actividad del promotor reprimiendo de ese modo la transcripción del correspondiente gen de polipéptido similar a IL-17. La delección de la caja TATA o el sitio de unión de un activador de la transcripción en el promotor puede lograrse generando un constructo de ADN que comprende todo o la parte relevante del/de los promotor(es) de polipéptido similar a IL-17 (de la misma especie o una especie relacionada que el/los gen(es) de polipéptido similar a IL-17 que va(n) a regularse) en el que uno o más de la caja TATA y/o los nucleótidos del sitio de unión de un activador transcripcional se mutan mediante sustitución, delección y/o inserción de uno o más nucleótidos. Como resultado, la caja TATA y/o el sitio de unión del activador tienen una actividad disminuida o se vuelven completamente inactivos. El constructo contendrá normalmente al menos aproximadamente 500 bases de ADN que corresponden a las secuencias de ADN en 5' y 3' nativo (endógeno) adyacentes al segmento de promotor que se ha modificado. El constructo puede introducirse en las células apropiadas (o bien *ex vivo* o bien *in vivo*) o bien directamente o bien mediante un vector viral tal como se describe en el presente documento. Normalmente, la integración del constructo en el ADN genómico de las células será mediante recombinación homóloga, en la que las secuencias de ADN en 5' y 3' en el constructo de promotor pueden servir para ayudar a integrar la región promotora modificada mediante hibridación con el ADN cromosómico endógeno.

Usos adicionales de polipéptidos y ácidos nucleicos de polipéptido similar a IL-17

Pueden usarse moléculas de ácido nucleico tal como se da a conocer en el presente documento (incluyendo las que no codifican por sí mismas para polipéptidos biológicamente activos) para mapear las ubicaciones del gen de polipéptido similar a IL-17 y genes relacionados en cromosomas. El mapeo puede realizarse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como amplificación por PCR e hibridación *in situ*.

Moléculas de ácido nucleico de polipéptido similar a IL-17 (incluyendo las que no codifican por sí mismas para polipéptidos biológicamente activos), pueden ser útiles como sondas de hibridación en ensayos de diagnóstico para someter a prueba, o bien cualitativamente o bien cuantitativamente, la presencia de un ADN de polipéptido similar a IL-17 o ARN correspondiente en muestras de fluido corporal o tejido de mamífero.

Los polipéptidos similares a IL-17 pueden usarse (simultánea o secuencialmente) en combinación con una o más citocinas, factores de crecimiento, antibióticos, antiinflamatorios y/o agentes quimioterápicos según sea apropiado para la indicación que esté tratándose.

Pueden emplearse también otros métodos cuando es deseable inhibir la actividad de uno o más polipéptidos similares a IL-17. Tal inhibición puede efectuarse mediante moléculas de ácido nucleico que son complementarias a y que se hibridan con secuencias de control de la expresión (formación de triple hélice) o con ARNm de polipéptido similar a IL-17. Por ejemplo, pueden introducirse en la célula moléculas de ARN o ADN antisentido, que tienen una secuencia que es complementaria a al menos una parte del/de los gen(es) de polipéptido similar a IL-17 seleccionado(s). Pueden diseñarse sondas antisentido mediante técnicas disponibles usando la secuencia del polipéptido similar a IL-17 dada a conocer en el presente documento. Normalmente, cada molécula antisentido de ese tipo será complementaria al sitio de iniciación (extremo 5') de cada gen de polipéptido similar a IL-17 seleccionado. Cuando la molécula antisentido se hibrida entonces con el correspondiente ARNm de polipéptido similar a IL-17, se impide o se reduce la traducción de este ARNm. Los inhibidores antisentido proporcionan información referente a la disminución o ausencia de un polipéptido similar a IL-17 en una célula u organismo.

Alternativamente, puede emplearse terapia génica para crear un inhibidor dominante-negativo de uno o más polipéptidos similares a IL-17. En esta situación, puede prepararse el ADN que codifica para un polipéptido mutante de cada polipéptido similar a IL-17 seleccionado e introducirse en las células de un paciente usando métodos o bien virales o bien no virales tal como se describe en el presente documento. Cada mutante de este tipo se diseña normalmente para competir con el polipéptido endógeno en su papel biológico.

Además, puede usarse un polipéptido similar a IL-17, ya sea biológicamente activo o no, como inmunógeno, es decir, el polipéptido contiene al menos un epítipo frente al que pueden generarse anticuerpos. Pueden usarse agentes de unión selectiva que se unen a un polipéptido similar a IL-17 (tal como se describe en el presente documento) para fines de diagnóstico *in vivo* e *in vitro*, incluyendo pero sin limitarse a, su uso en forma marcada para detectar la presencia de polipéptido similar a IL-17 en una muestra de células o fluido corporal. Los anticuerpos pueden usarse también para prevenir, tratar o diagnosticar varias enfermedades y trastornos, incluyendo los mencionados en el presente documento. Los anticuerpos pueden unirse a un polipéptido similar a IL-17 para disminuir o bloquear al menos una actividad característica de un polipéptido similar a IL-17, o pueden unirse a un polipéptido para aumentar al menos una actividad característica de un polipéptido similar a IL-17 (incluyendo mediante el aumento de la farmacocinética del polipéptido similar a IL-17).

Los siguientes ejemplos son para fines de ilustración.

EJEMPLO 1

Clonación de IL17E humano

Se realizó una búsqueda del perfil de la familia de IL-8 de la base de datos dbEST de Amgen y Genbank, dando como resultado la identificación del EST de ratón, zmgbi-ai430337. (Smith *et al.* (1994), Cell, 76: 959-62; Luethy *et al.* (1994), Protein Science, 3: 139-46). La homología global entre la secuencia de aminoácidos pronosticada de zmgbi-ai430337 y la IL-8 humana era baja; sin embargo, la conservación de cisteínas y otros residuos clave sugería que zmgbi-ai430337 era un miembro novedoso de la familia de IL-17. Se obtuvo el clon correspondiente a la secuencia EST de ratón del NIH I.M.A.G.E. Consortium through Research Genetics (una compañía de Invitrogen; Huntsville, AL) y se secuenció completamente. Una búsqueda BLAST reveló que la secuencia EST de ratón correspondía a regiones de la secuencia del clon BAC de GenBank CNS0000B, que es una secuencia de ADN genómico derivada del cromosoma humano 14. Búsquedas BLAST adicionales también revelaron coincidencias con secuencias genómicas humanas de Celera. La similitud con las secuencias tanto de GenBank como de Celera sugería que era un homólogo humano para el miembro de la familia de IL-17 de ratón novedoso identificado.

Se diseñaron dos cebadores de PCR basados en la secuencia genómica humana para examinar diversas bibliotecas de ADNc (Clontech) para detectar el ADNc relacionado con IL-17. El cebador directo, designado 2392-73 tiene la secuencia AGA GTC CTG TAG GGC CAG TGA AGA TGG (SEQ ID NO: 15). El cebador inverso, designado 2374-88, tiene la secuencia TAC AGC CTG CGC TCC AGG CAG TAG CC (SEQ ID NO: 16). Este examen indicó que los testículos humanos eran la fuente más abundante entre las muestras de ADNc examinadas.

Con el fin de obtener un clon de ADNc humano de longitud completa, se obtuvo la biblioteca de ADNc de testículos humanos Rapid Screen (LTS-1001) de Origene Technologies Inc. (Rockville, MD). La biblioteca de ADNc de Origene estaba en el vector pCMV6-XL4. Se usaron condiciones de PCR convencionales para todo el examen de la biblioteca de ADNc. Según las especificaciones del producto de Origene, la biblioteca contenía 500.000 clones alineados en una placa primaria de 96 pocillos. Cada pocillo de la placa primaria contenía por tanto aproximadamente 5.000 clones. El pocillo 3B de la placa primaria era positivo. Se adquirió la subplaca secundaria correspondiente al pocillo positivo 3B en la placa primaria de Origene. El examen posterior demostró que el número de pocillo 55 en la subplaca secundaria 3B era positivo.

La subplaca secundaria de Origene contenía diluciones madre en glicerol de *E. coli* amplificada a partir de 50 clones originales. Se sembraron en placa diluciones en serie del número de pocillo positivo 55 a densidades de 1:10, 1:100 y 1:1.000 en placas LB Amp. Se recogieron individualmente colonias (96) de las placas LB Amp y se usaron para el examen por PCR con los cebadores 2392-73 y 2374-88 (descritos anteriormente). Se identificaron cuatro colonias positivas usando este procedimiento. Se designaron las colonias positivas como clon 70, 78, 85 y 89. Se prepararon los ADN de plásmido correspondientes a estas colonias y se secuenciaron usando una combinación de cebadores de vector y cebadores específicos de gen. Se secuenció completamente el clon 89 y se secuenciaron los otros clones en los extremos y en la secuencia codificante. Los datos revelaron que los cuatro clones tenían secuencias codificantes idénticas.

El ADNc de polipéptido similar a IL-17 humana (clon Origene-89) tiene 3987 pb de longitud y se expone como SEQ ID NO: 1. Este ADNc codifica para un marco de lectura abierto de 161 aminoácidos con un péptido señal pronosticado de 16 aminoácidos y una proteína madura pronosticada de 145 aminoácidos (SEQ ID NO: 2). Una búsqueda FASTA de la base de datos SwissProt con la secuencia de proteína de polipéptido similar a IL-17 pronosticada indicó que SEQ ID NO: 2 presentaba un 25,0% de identidad dentro de un solapamiento de 160 aminoácidos con IL-17, un 36,7% de identidad dentro de un solapamiento de 90 aminoácidos con IL-20, un 35,6% de identidad dentro de un solapamiento de 90 aminoácidos con IL-17B y un 34,5% de identidad dentro de un

solapamiento de 171 aminoácidos con IL-17C. De manera similar a otros miembros de la familia de IL-17, se pronostica que el polipéptido similar a IL-17 humana novedoso (también denominado IL-17E en el presente documento) es una proteína secretada y se pronostica que es una citocina.

EJEMPLO 2

5 Ratones transgénicos que sobreexpresan polinucleótidos de polipéptido similar a IL-17

A. Preparación del transgén.

Se ligó la región codificante de ADNc de polipéptido similar a IL-17 humana (SEQ ID NO: 1) con una secuencia de Kozak alterada, CCACC, inmediatamente en el sentido de 5' del ATG iniciador, en un vector de expresión específico de hígado. El vector de expresión consistía en un fragmento de ADN de 774 pb que contenía la región de control de hepatocitos (HCR) de la región intergénica C-I/C-I' de apolipoproteína humana (apo) en el cromosoma 19 (Simonet *et al.*, J. Biol. Chem., 268:8221-8229, 1993). El vector también contenía un trozo de ADN continuo de 1450 pb que consistía en la secuencia flanqueante en 5' del gen de apoE humana, el primer exón, el primer intrón y una parte del segundo exón del gen de apoE (Simonet *et al.*, J. Clin. Invest., 94:1310-1319, 1994). Se ubicó una señal de poliadenilación de SV40 en el sentido de 3' de los sitios de inserción de ADNc. Se verificó la integridad del ADNc mediante secuenciación usando métodos convencionales conocidos en la técnica.

B. Preparación y análisis de ratones transgénicos.

Se purificó el plásmido resultante (indicado en el presente documento como ApoE-hIL-17) y se aisló el inserto transgénico para la microinyección. Se inyectaron embriones de una única célula de ratones con cruzamiento BDF1 x BDF1 esencialmente tal como se describe en Brinster *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4438-4442, 1985). Se cultivaron los embriones durante la noche en un incubador a 37°C y un 5% de CO₂. Posteriormente, se transfirieron de 15 a 20 embriones de 2 células a los oviductos de trece ratones hembra CD1 pseudopreñadas. Se identificaron las crías transgénicas mediante examen por PCR con cebadores que amplifican un fragmento de 368 pb del primer intrón de apoE humana a partir de ADN preparado a partir de biopsias de oreja tal como se describe en Simonet *et al.* (J. Clin. Invest., 94:1310-1319, 1994).

25 EJEMPLO 3

Análisis mediante necropsia de los ratones transgénicos.

A las 8-10 semanas de edad, se sometieron a necropsia 10 ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 y cinco compañeros de camada no transgénicos. Se congelaron inmediatamente muestras de hígado de los ratones en nitrógeno líquido en el momento de la necropsia. Se aislaron los ARN de cada muestra usando el kit de ARN Perfect (Eppendorf) según las instrucciones del fabricante y se analizaron mediante análisis de transferencia de tipo Northern.

Se generó la transferencia de tipo Northern procesando 10 µg de ARN diluido en colorante de carga de ARN 1x (Sigma) en un gel de formaldehído-agarosa al 1%. Se desnaturalizó el gel en NaOH 50 mM y NaCl 150 y 55 mM. Posteriormente, se neutralizó el gel en Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0) y NaCl 150 mM y se sometió a transferencia sobre una membrana Duralon según las instrucciones del fabricante (Stratagene). Se estudió con sonda la transferencia de tipo Northern con un ADNc de polipéptido similar a IL-17 humana marcado con ³²P generado mediante el sistema Rediprime (Amersham). Se llevó a cabo la hibridación en disolución Express Hyb y entonces se lavó según las instrucciones del fabricante. Se expuso la transferencia hibridada a película de rayos X (Kodak) durante 72 horas a -80°C y luego se reveló.

40 El análisis de transferencia de tipo Northern indicaba que los ratones fundadores transgénicos tenían una expresión aumentada del ARN de polipéptido similar a IL-17 en comparación con los compañeros de camada no transgénicos. De los 10 ratones sometidos a prueba, los indicados como n.^{os} 29, 52, 55, 61 y 66 tenían el nivel más alto de expresión de ARN de polipéptido similar a IL-17. (Véase la figura 7)

B. Análisis de la expresión en los fundadores restantes

45 Se obtuvieron los hígados de los ratones fundadores transgénicos restantes junto con ratones control, mediante hepatectomía parcial. Se anestesiaron los ratones mediante isoflurano y se hizo una pequeña incisión transversal por debajo de la apófisis xifoides del esternón para exponer el hígado. Se colocó una sutura alrededor del lóbulo del hígado seleccionado para la extirpación en el punto de unión. Se ligó el lóbulo del hígado y se retiró cortando por debajo de la ligadura y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Se comprobó el ratón para detectar hemorragia y se cerró la incisión cutánea con 1-2 pinzas automáticas (grapas cutáneas). Se llevó a cabo el aislamiento del ARN del hígado y el análisis de transferencia de tipo Northern tal como se describió anteriormente. Se expuso la transferencia hibridada a película de rayos X (Kodak) durante 24 horas a -80°C y luego se reveló.

El análisis de transferencia de tipo Northern en los fundadores restantes indicó que estos ratones expresaban niveles superiores de ARN de polipéptido similar a IL-17 en el hígado en comparación con compañeros de camada

no transgénicos. Los ratones indicados como n.^{os} 11, 30, 33, 46 y 68 expresaban los niveles más altos de ARN de IL-17. (Véase la figura 8).

EJEMPLO 4

Análisis patológico de ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17

5 A. Necropsia

En este estudio, se analizaron patológicamente siete ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17, de 6-8 semanas de edad así como cinco compañeros de camada no transgénicos de 6-8 semanas de edad (dos machos y tres hembras) para determinar un posible fenotipo de polipéptido similar a IL-17. Los ratones n.^{os} 29, 52, 61 y 66 eran fuertemente positivos para la expresión hepática de ARNm de polipéptido similar a IL-17, mientras que los ratones n.^{os} 1, 16 y 55 eran débilmente positivos. Los cinco ratones control no transgénicos (n.^{os} 2, 17, 28, 53 y 65) eran negativos. En la necropsia, se pesaron los ratones, se extrajo sangre para hematología y química sérica, y se pesaron el hígado, el bazo, el riñón, el corazón y el timo. Se recogieron secciones de hígado, bazo, pulmón, cerebro, corazón, riñón, glándula suprarrenal, estómago, intestino delgado, páncreas, ciego, colon, ganglio linfático mesentérico, piel, glándula mamaria, tráquea, esófago, tiroides, paratiroides, glándula salival, vejiga urinaria, ovario o testículo, útero o vesícula seminal, músculo esquelético, hueso y médula ósea para el análisis histológico.

B. Histología

Se fijaron secciones de hígado, bazo, pulmón, cerebro, corazón, riñón, glándula suprarrenal, estómago, intestino delgado, páncreas, ciego, colon, ganglio linfático mesentérico, piel, glándula mamaria, tráquea, esófago, tiroides, paratiroides, glándula salival, vejiga urinaria, ovario o testículo, útero o vesícula seminal, músculo esquelético, hueso y médula ósea de los ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 y no transgénicos durante la noche en formalina de zinc tamponada neutra al 10% (Anatech, Battle Creek, Michigan), se incrustaron en parafina, se cortaron a 3 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para el examen histológico de rutina.

C. Inmunohistoquímica

Se realizó tinción inmunohistoquímica sobre secciones incrustadas en parafina de 4 µm de grosor usando un sistema de tinción histoquímica DPC Mark 5 automatizado (Diagnostic Products Corp, Randolph, NJ). Se bloquearon secciones de tejido desparafinizadas con CAS BLOCK (Zymed Laboratories, San Francisco, CA), se incubaron con un anticuerpo monoclonal de rata anti-ratón dirigido contra macrófagos (F4/80, Serotec Inc., Raleigh, NC) o un anticuerpo monoclonal de rata anti-CD45R/B220 de ratón dirigido contra todos los tipos de células B (PharMingen, San Diego, CA). Se detectó el anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario de conejo anti-inmunoglobulina de rata biotinilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Entonces se extinguieron las secciones con peróxido de hidrógeno al 3% y se hicieron reaccionar con complejo terciario de avidina-biotina (Vector Laboratories). Se visualizó la reacción de tinción con diaminobencidina (DAB, Dako Carpintería, CA) y se contratificaron las secciones con hematoxilina.

D. Hallazgos de patología macroscópica

Los ganglios linfáticos mesentéricos de los cuatro ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 de alta expresión (n.^{os} 29, 52, 61 y 66) más uno de los ratones de baja expresión (n.^o 55) tenían un tamaño notablemente aumentado. De manera similar, los bazos de estos cinco ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 estaban alargados y presentaban un aumento significativo en el peso (1,08 ± 0,27 DE en % de peso corporal frente a 0,37 ± 0,12 DE en % de peso corporal en ratones control no transgénicos, p=0,0007). Los ganglios linfáticos mesentéricos y los bazos de los otros dos ratones transgénicos de baja expresión (n.^{os} 1 y 16) parecían normales. Se muestra en la tabla 1 los datos de peso de órganos sin procesar y se resumen en la tabla 3 diferencias significativas.

Tabla 1 Pesos de órganos sin procesar para ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 frente a ratones no transgénicos

Grupo	Sexo	PCT	Hígado	% de PC	Bazo	% de PC	Corazón	% de PC
No transgénico								
2	F	21,8	0,923	4,23	0,070	0,32	0,121	0,56
17	F	20,5	0,912	4,45	0,089	0,43	0,112	0,55
28	F	22,5	1,125	5	0,123	0,55	0,127	0,56
53	M	25,8	1,315	5,1	0,076	0,29	0,140	0,54
65	M	29	1,45	5	0,082	0,28	0,169	0,58
Media				4,76		0,37		0,56
Des. est.				0,39		0,12		0,01

Transgénico

para IL17								
1	F	31,9	1,406	4,41	0,118	0,37	0,151	0,47
16	F	22,5	1,121	4,98	0,085	0,38	0,115	0,51
29	F	24,4	1,439	5,90	0,333	1,36	0,123	0,5
52	M	25,6	1,583	6,18	0,223	0,87	0,129	0,5
55	F	19,1	1,181	6,18	0,196	1,03	0,122	0,64
61	F	24,5	1,401	5,72	0,190	0,78	0,118	0,48
66	M	25	1,47	5,88	0,338	1,35	0,162	0,65
Media				5,61		0,88		0,54
Des. est.				0,67		0,41		0,08
Grupo								
No transgénico			Corazón	% de PC	Riñones	% de PC	Timos	% de PC
2	F	21,8	0,121	0,56	0,351	1,61	0,061	0,28
17	F	20,5	0,112	0,55	0,273	1,33	0,048	0,23
28	F	22,5	0,127	0,56	0,398	1,77	0,058	0,26
53	M	25,8	0,140	0,54	0,423	1,64	0,031	0,12
65	M	29	0,169	0,58	0,523	1,8	0,055	0,19
Media				0,56		1,63		0,22
Des. est.				0,01		0,19		0,06
Transgénico para polipéptido similar a IL-17								
1	F	31,9	0,151	0,47	0,433	1,36	0,071	0,22
16	F	22,5	0,115	0,51	0,350	1,56	0,061	0,27
29	F	24,4	0,123	0,5	0,861	3,53	0,061	0,25
52	M	25,6	0,129	0,5	0,356	1,39	0,074	0,29
55	F	19,1	0,122	0,64	0,388	2,03	0,04	0,21
61	F	24,5	0,118	0,48	0,372	1,52	0,059	0,24
66	M	25	0,162	0,65	0,433	1,73	0,026	0,1
Media				0,54		1,87		0,23
Des. est.				0,08		0,76		0,06

E. Hallazgos de hematología

5 Cuatro de los cinco ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 con bazos y ganglios linfáticos mesentéricos alargados (la sangre de los ratones n.ºs 29, 52, 55, 61 y 66 coaguló y no pudo evaluarse) tenían aumentos de moderados a marcados en leucocitos totales, neutrófilos, linfocitos, eosinófilos y células no teñidas grandes (posiblemente linfocitos granulares grandes). El recuento de leucocitos totales medio para estos cuatro ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 era de $11,93 \times 10^3$ ($\pm 4,47 \times 10^3$ DE) mientras que los ratones control no transgénicos tenían un recuento de leucocitos totales medio de $3,09 \times 10^3$ ($\pm 0,79 \times 10^3$ DE, $p=0,003$). El recuento de neutrófilos medio en estos cuatro ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 era de $2,29 \times 10^3$ ($\pm 0,67 \times 10^3$ DE) frente a $0,92 \times 10^3$ ($\pm 0,53 \times 10^3$ DE) en ratones control no transgénicos, $p=0,032$. Estos cuatro ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 tenían un recuento de linfocitos medio de $6,76 \times 10^3$ ($\pm 2,32 \times 10^3$) frente a $1,99 \times 10^3$ ($\pm 0,38 \times 10^3$ DE) en ratones control no transgénicos, $p=0,0025$, un recuento de eosinófilos medio de $1,35 \times 10^3$ ($\pm 0,96 \times 10^3$ DE) frente a $0,03 \times 10^3$ ($\pm 0,01 \times 10^3$ DE) en ratones control no transgénicos, $p=0,017$, y un recuento de células no teñidas grandes medio de $1,41 \times 10^3$ ($\pm 1,11 \times 10^3$ DE) frente a $0,10 \times 10^3$ ($\pm 0,05 \times 10^3$ DE) en ratones control no transgénicos, $p=0,031$. Dos de los ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 (n.ºs 55 y 66) tenían también una anemia leve caracterizada por una ligera disminución en el número de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito así como recuentos de plaquetas ligeramente elevados. Se muestran en la tabla 2 los datos de hematología sin procesar y se resumen en la tabla 3 diferencias significativas.

Tabla 2 Datos de hematología sin procesar para ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 frente a ratones no transgénicos

Grupo	WBC	RBC	HGB	HCT	PLT	MPV	Neut.	Linf.	Mono.	Eos.	Baso.	LUC
No transgénico												
2	2,52	9,39	13,9	48,9	1179	5,0	0,69	1,64	0,02	0,03	0,01	0,13
17	3,48	10,12	15,1	50,9	938	5,1	0,72	2,63	0,02	0,04	0,01	0,06
28	2,45	9,51	14,8	49,5	1013	5,7	0,37	2,00	0,02	0,01	0,01	0,05
53	2,70	10,67	16,1	55,9	1353	5,0	0,61	1,88	0,04	0,04	0,01	0,11
65	4,30	11,55	17,8	61,4	1362	4,5	2,20	1,81	0,11	0,02	0,01	0,16

Media	3,09	10,25	15,5	53,3	1169	5,1	0,92	1,99	0,04	0,03	0,01	0,10
Des. est.	0,79	0,89	1,5	5,3	193	0,4	0,73	0,38	0,04	0,01	0,00	0,05
Trans-génico para polipéptido similar a IL-17												
1	2,80	10,80	16,3	56,8	1113	5,2	0,69	1,91	0,03	0,02	0,01	0,14
16	3,49	10,29	15,8	54,7	1134	4,8	1,30	2,01	0,05	0,04	0,01	0,07
29	Sin muestra											
52	13,32	8,81	12,5	45,8	977	6,3	3,25	6,61	0,17	2,12	0,04	1,13
55	16,89	7,89	12,0	36,6	2758	5,4	1,84	9,80	0,09	2,14	0,04	2,99
61	11,32	9,18	14,1	50,0	1102	5,2	2,66	6,47	0,08	0,96	0,03	1,12
66	6,19	6,24	7,8	31,7	2195	4,4	1,42	4,16	0,05	0,16	0,01	0,40
Media	9,00	8,87	13,1	45,9	1547	5,2	1,86	5,16	0,08	0,91	0,02	0,98
DE	5,71	1,66	3,1	10,0	744	0,6	0,94	3,06	0,05	1,01	0,02	1,09

Tabla 3 Datos de resumen para diferencias significativas en pesos de órganos y valores de CBC entre ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 y ratones no transgénicos

Peso del bazo como % del peso corporal	Ratones transgénicos para HEAGP (n=4 ó 5*)	Ratones no transgénicos (n=5)	Valor de p (prueba de la t)
	1,08 ± 0,27 DE*	0,37 ± 0,12 DE	0,007
Leucocitos totales (WBC)	11,93 x 10 ³ ± 4,47 x 10 ³ DE	3,09 x 10 ³ ± 0,79 x 10 ³ DE	0,003
Neutrófilos	2,29 x 10 ³ ± 0,67 x 10 ³ DE	0,92 x 10 ³ ± 0,53 x 10 ³ DE	0,032
Linfocitos	6,76 x 10 ³ ± 2,32 x 10 ³ DE	1,99 x 10 ³ ± 0,38 x 10 ³ DE	0,0025
Eosinófilos	1,99 x 10 ³ ± 0,38 x 10 ³ DE	0,03 x 10 ³ ± 0,01 x 10 ³ DE	0,017
Células no teñidas grandes (LUC, posiblemente linfocitos granulares grandes)	1,41 x 10 ³ ± 1,11 x 10 ³ DE	0,10 x 10 ³ ± 0,05 x 10 ³ DE	0,031

F. Hallazgos histopatológicos

5 Se examinaron secciones teñidas con hematoxilina y eosina de hígado, bazo, pulmón, cerebro, corazón, riñón, glándula suprarrenal, estómago, intestino delgado, páncreas, ciego, colon, ganglio linfático mesentérico, piel, glándula mamaria, tráquea, esófago, tiroides, paratiroides, glándula salival, vejiga urinaria, ovario o testículo, útero o vesícula seminal, músculo esquelético, hueso y médula ósea de siete ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 y cinco compañeros de camada control no transgénicos. Se examinaron también secciones de ganglio linfático y bazo inmunoteñidas con B220 (específico para todas las células B) y F4/80 (específico para macrófagos) de todos los ratones. Cinco de los ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 (n.ºs 29, 52, 55, 61 y 66) tenían hallazgos histológicos similares caracterizados por linfadenopatía mesentérica marcada, hiperplasia linfoide esplénica e hiperplasia mieloide eosinofílica de la pulpa roja, e hiperplasia eosinofílica de la médula ósea. El hallazgo histológico más sorprendente era la linfadenopatía mesentérica, que se caracterizaba por un alargamiento ganglionar masivo con pérdida de la arquitectura ganglionar normal y expansión medular por una población mixta de células inflamatorias que contenía un gran número de eosinófilos, células B reactivas (teñidas con B220) y células plasmáticas, macrófagos (teñidos con F4/80) y células gigantes inflamatorias multinucleadas (véase la figura 9). Estos cinco ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 también presentaban hiperplasia mieloide eosinofílica de la médula ósea marcada (figura 10B) así como hiperplasia linfoide de células B esplénica de moderada a marcada e hiperplasia mieloide eosinofílica de la pulpa roja (figura 10F). Además, uno de los ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 (n.º 29) también presentaba pielonefritis eosinofílica y supurativa crónica, marcada con dilatación pélvica renal en un riñón y pielitis eosinofílica y supurativa crónica moderada en el otro riñón (figura 10J), mientras que otro ratón transgénico para polipéptido similar a IL-17 (n.º 55) presentaba cistitis urinaria eosinofílica y supurativa crónica, grave con pielitis eosinofílica y supurativa crónica bilateral leve. Por último, cuatro de los ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 (n.ºs 29, 55, 61 y 66) presentaban colitis y/o ileítis eosinofílica y linfoplasmacítica de mínima a leve.

G. Resumen de hallazgos fenotípicos en ratones transgénicos que sobreexpresan polipéptido similar a IL-17 humana

30 Cinco de los ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 (n.ºs 29, 52, 55, 61 y 66) tenían un fenotipo similar, caracterizado por una leucocitosis con elevaciones marcadas en eosinófilos, linfocitos y células no teñidas grandes que pueden ser linfocitos granulares grandes, una linfadenopatía marcada con un componente eosinofílico marcado,

hiperplasia mieloide eosinofílica de la médula ósea e hiperplasia linfoide de células B esplénica e hiperplasia mieloide eosinofílica. Dos de los ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 (n.^{os} 55 y 66) también presentaban trombocitosis y anemia leve. Además, los ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 n.^{os} 55 y 29 presentaban inflamación eosinofílica y superlativa de sus riñones y/o vejiga urinaria. Por último, cuatro de los ratones transgénicos para polipéptido similar a IL-17 (n.^{os} 29, 55, 61 y 66) tenían colitis y/o ileítis eosinofílica y linfoplasmacítica de mínima a leve. Todos estos hallazgos sugieren que la proteína de polipéptido similar a IL-17 desempeña un papel en la inflamación y mielopoyesis, particularmente en el desarrollo, la estimulación y/o el reclutamiento de eosinófilos y linfocitos B.

EJEMPLO 5

10 Fenotipo transgénico de ratones que sobreexpresan polipéptido similar a IL-17

Se realizó el análisis del fenotipo en 10 ratones transgénicos y 5 compañeros de camada no transgénicos. Se obtuvieron un fémur, sangre periférica (obtenida mediante punción cardiaca) y media sección longitudinal del bazo de cada ratón transgénico y su control de compañero de camada. Cinco de los ratones transgénicos analizados (n.^{os} 29, 52, 55, 61 y 66) presentaban cambios fenotípicos.

15 Para analizar el fenotipo de los ratones transgénicos, se cuantificaron las poblaciones hematopoyéticas principales incluyendo células T activadas. Además, se cuantificó la expresión específica de tejido y linaje del receptor de polipéptido similar a IL-17, IL-17RB, tal como se describe en el ejemplo 6 en el presente documento.

Se designó el siguiente panel de anticuerpos para realizar las mediciones identificadas anteriormente con clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se usó anticuerpo frente a CD4-PE para detectar células T auxiliares. CD69 es un marcador de activación temprana y se usó anticuerpo frente a CD69-FITC para detectar todas las células activadas. Se usó anticuerpo frente a CD3-FITC para detectar todas las células T. Se usó anticuerpo frente a CD8-PE para detectar células T citolíticas. Se usó anticuerpo frente a CD14-FITC para detectar células del linaje de monocitos. Se usó anticuerpo frente a CD19-PE para detectar células del linaje B (preB para célula B positiva para inmunoglobulina de la superficie madura). Se usó anticuerpo frente a GR-1-FITC para detectar granulocitos. Se usó anticuerpo frente a NK1.1-PE para detectar células citolíticas naturales. Se detectó el patrón de expresión del receptor de citocina similar a IL-17 (IL17RB) mediante unión de la proteína de fusión Fc-polipéptido similar a IL-17 recombinante y se reveló con anticuerpos anti-ser humano-FITC apropiados. Se usó anticuerpo frente a CD45R-PE para detectar células B. Se usó anticuerpo frente a CD11-PE para detectar células dendríticas. Se usó anticuerpo frente a CD5 como posible indicador de leucemia/linfoma cuando se expresa conjuntamente con CD19. Se usó también anticuerpo frente a CD34 como posible indicador de leucemia/linfoma cuando se expresa conjuntamente con CD19. (Tal como se describe en el ejemplo 10). Se obtuvieron todos los anticuerpos de BD-Pharmingen, San Diego, CA.

Se sacrificaron los ratones transgénicos y los compañeros de camada no transgénicos y se diseccionaron los fémures y los bazos. Se hizo una suspensión celular de la médula ósea femoral y el bazo, se lavó dos veces y se resuspendió en PBS/BSA al 0,5%. Se cuantificó el número de células de cada suspensión celular con un contador Coulter Z1 de Coulter usando una apertura de 100 μm y un parámetro de umbral inferior de 4 μm . Se añadió una alícuota de 10 μl de cada suspensión celular a 10 ml de tampón Isoton que contenía 3 gotas de Zapoglobin (para lisar los glóbulos rojos) y se contaron. Se incubaron las suspensiones celulares con Fc-block (CD 16/32) durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se añadieron 1×10^6 células (suspendidas en PBS/BSA al 0,5%) a cada pocillo que contenía anticuerpo en una placa de 96 pocillos.

Además, se obtuvieron muestras de sangre periférica de los ratones transgénicos y los compañeros de camada no transgénicos mediante punción cardiaca y se realizó el análisis de CBC. Posteriormente, se dividió la sangre restante por igual entre 8 pocillos que contenían los anticuerpos en una placa de 96 pocillos.

Se incubaron las suspensiones celulares y las muestras de sangre en presencia de los anticuerpos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron las células dos veces y se lisaron con tampón de lisis de FACS (200 μl /pocillo; Becton Dickinson) durante 15 minutos a temperatura ambiente con el fin de eliminar los glóbulos rojos. Tras lisar, se lavaron las células y se resuspendieron en 400 μl de tampón de FACS y se analizaron mediante citometría de flujo.

En los 5 ratones transgénicos que presentaban un fenotipo (n.^{os} 29, 52, 55, 61 y 66), había un aumento sorprendente en células CD19+ (células B) en la sangre periférica. Tal como se muestra en la figura 11, el número absoluto de células CD19+ aumentó hasta 5 veces en comparación con los controles. Además, había un aumento de 2-4 veces en el número absoluto de células CD19+ en el bazo tal como se muestra en la figura 12. En la médula ósea femoral, había una ligera disminución en células CD19+ (figura 13). La tinción para CD45r seguía una tendencia similar. La sangre periférica y los bazos aislados de los ratones transgénicos también presentaban un aumento de 2-3 veces en el número absoluto de células T auxiliares (linfocitos T CD4+). (Véanse las figuras 14 y 15; respectivamente).

Los ratones transgénicos tenían una aparición constante de una población de células grande (por ejemplo, un 33%

de granulocitos) que tenían propiedades de dispersión de luz similares a las de eosinófilos (figuras 16 y 17). Además, las células no expresan el marcador granulocítico. Había también una aparición constante de una población más pequeña pero distinta de células similares a granulocitos (por ejemplo, un 8-17% de granulocitos) que expresan el IL-17RB en sangre y médula ósea. (Véanse las figuras 18 y 19). Basándose en correlaciones con los puntos de dispersión, los ratones transgénicos parecen tener el siguiente fenotipo de múltiples linajes: CD4+, CD45R+, CD11C+ y son grandes y granulares.

Este análisis indicó que dentro de los ratones transgénicos había un surgimiento claro de una población similar a eosinófilos en la médula ósea femoral y sangre periférica. Tal como se muestra en la figura 20, el perfil de dispersión de estas células se asemeja estrechamente a un ejemplo de "libro de texto" de las propiedades de dispersión directa frente a lateral (tamaño frente a granularidad) de los eosinófilos.

Había también un aumento importante en el número absoluto (y porcentaje compartimental) de células B CD19+ circulantes y esplénicas. Aunque los linfocitos CD19+ no eran positivos para el marcador de activación CD69+, su aumento en número absoluto en la periferia y la ligera disminución en la médula ósea parecen indicar una migración a los tejidos periféricos en los que está teniendo lugar la proliferación.

La aparición de un fenotipo de múltiples linajes en sangre y médula ósea parece indicar un fenotipo similar a linfoma. Estos resultados se describen adicionalmente en el ejemplo 10. Además, puesto que IL-17RB parece estar regulado por incremento en estas células, parece indicar que esta población puede ser reactiva frente a la omnipresencia de proteína de polipéptido similar a IL-17. Junto con el hecho de que hay una clara eosinofilia en estos ratones, el fenotipo de múltiples linajes se ajusta estrechamente a la descripción de una leucemia mielomonocítica aguda (LMA M4) (Campena & Behm, J. Immunol. Met. 234:59-75, 2000).

EJEMPLO 6

Proteína de fusión Fc-polipéptido similar a IL-17 humana recombinante:

Se diseñó por ingeniería genética un péptido señal de Epogen (EpoSP) fusionado en marco a la proteína madura pronosticada del polipéptido similar a IL-17 humana (SEQ ID NO: 2) que se fusionó en marco con la región constante de cadena pesada (Fc) de IgG1 para preparar una proteína de polipéptido similar a IL-17 humana madura recombinante. Se insertó el ADN de EpoSP que codifica para la secuencia de aminoácidos MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLG (SEQ ID NO: 11) en el vector de expresión pCEP4 (Invitrogen) entre una secuencia de Kozak consenso (CCACC) en su extremo 5' y un sitio Ascl en su extremo 3'. Además, se insertó el ADN de Fc que codifica para la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12 y un sitio de restricción NotI en el extremo 5' de la secuencia en el extremo 3' del EpoSP (SEQ ID NO: 11). Se insertó una timidina inmediatamente tras el sitio de restricción NotI con el fin de mantener el marco codificante igual. El vector resultante que contiene el EpoSP y la Fc en pCEP4 se denomina vector pCEP4-EpoSP-Fc.

Se generó mediante PCR un fragmento de ADN, que contenía un sitio de restricción Ascl en el extremo 5' y un sitio de restricción NotI en el extremo 3', que codifica para la proteína de polipéptido similar a IL-17 humana madura (SEQ ID NO: 2) sin el codón de terminación. La proteína de polipéptido similar a IL-17 humana madura comienza en el número de aminoácido 17 (aa17) con la metionina de partida como aminoácido número uno. Se insertó el sitio Ascl, que contiene una timidina, inmediatamente antes del codón que contiene el residuo 17 con el fin de mantener el marco codificante igual. Se ligó direccionalmente el fragmento de polipéptido similar a IL-17 humana en el vector de expresión pCEP4-EpoSP-Fc usando los sitios de restricción Ascl y NotI y se denominó pCEP4-EpoSP-huIL-17 like-Fc. Se confirmó la integridad del ADN y los sitios de unión mediante secuenciación del ADN usando métodos convencionales conocidos en la técnica.

Se transfectó transitoriamente el plásmido pCEP4-EpoSP-huIL-17 like-Fc en células 293/EBNA humanas usando Superfect (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Se recogió el medio condicionado libre de suero de las células 72 horas tras la transfección. Se aisló la proteína de fusión Fc-polipéptido similar a IL-17 humana recombinante, que se pronostica que tiene la secuencia de aminoácidos APS ubicada en el extremo amino-terminal de la proteína madura, mediante cromatografía de afinidad usando una columna de proteína G HiTrap (Amersham Pharmacia). Entonces se dializó la proteína de fusión Fc-polipéptido similar a IL-17 humana recombinante frente a tampón PBS durante 72 horas a 4°C usando una membrana Spectra/Pore con un MWCO de 10.000 (Spectrum Laboratories). Posteriormente, se sometió a electroforesis la proteína de fusión Fc-polipéptido similar a IL-17 humana recombinante sobre un gel de acrilamida al 10% (Novex) y se tiñó con azul de Coomassie. Se exploró el gel teñido con un densitómetro para determinar el porcentaje de representación de la banda de proteína de interés. Se usó reactivo de ensayo de proteínas Lowry modificado (Pierce) para determinar la concentración de proteína total según las instrucciones del fabricante. Entonces, se calculó la cantidad de proteína de fusión Fc-polipéptido similar a IL-17 humana multiplicando el porcentaje de proteína de fusión Fc-polipéptido similar a IL-17 por la concentración de proteína total.

EJEMPLO 7

Proteína de fusión Fc-receptor B de IL-17 humana recombinante:

Se clonaron polipéptidos de receptor B de IL-17 tal como se describe en la solicitud de patente estadounidense con número de serie 09/723.232 presentada el 27 de noviembre de 2000, cuya descripción se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad. Para preparar proteínas de fusión Fc-receptor B de IL-17 (IL-17RB-Fc), se fusionó el dominio extracelular del polipéptido similar a receptor de IL-17 humana (aminoácido n.º 1-292 para IL-17RB-2, aminoácido n.º 1-350 para IL-17RB-3 de SEQ ID NO: 18 y 20, respectivamente) con la región constante de cadena pesada (Fc) de IgG1 humana. Se ligó direccionalmente el fragmento de ADN que codifica para Fc humana (secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 12) con un sitio de restricción NotI en su extremo 5' y un sitio de restricción XhoI en su extremo 3' en el vector pCEP4 usando los sitios NotI y XhoI. El vector resultante que contiene la secuencia que codifica para Fc en pCEP4 se denomina vector pCEP4-Fc. Se generaron mediante PCR fragmentos de ADN que codifican para el dominio extracelular del IL-17RB-2 o IL-17RB-3 humano (SEQ ID NO: 18 y 20 respectivamente), con un sitio de restricción Hind III y una secuencia de Kozak (CCACC) en su extremo 5' y un sitio de restricción NotI en su extremo 3'. Se ligaron direccionalmente estos fragmentos de ADN en el vector de expresión pCEP4-Fc usando los sitios de restricción Hind III y NotI y se denominaron pCEP4-huIL-17RB-2 like-Fc o pCEP4-huIL-17RB-3 like-Fc. Se confirmó la identidad del ADN y los sitios de unión mediante secuenciación del ADN usando métodos convencionales conocidos en la técnica.

Se transfectaron transitoriamente el plásmido pCEP4-huIL-17RB-2 like-Fc o el plásmido pCEP4-huIL-17RB-3 like-Fc (también denominados HIL-17RB-2-Fc y HIL17RB-3-Fc, respectivamente, y depositados el 14 de marzo de 2001 en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110, EE.UU. con los números de registro _____ y _____, respectivamente) en células 293/EBNA humanas usando Superfect (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Se recogió el medio condicionado libre de suero de las células 72 horas tras la transfección. Se aislaron las proteínas de fusión Fc-IL-polipéptido similar a 17RB humano recombinante, que se pronostica que tienen la secuencia de aminoácidos APS ubicada en el extremo amino-terminal de la proteína madura, mediante cromatografía de afinidad usando una columna de proteína G HiTrap (Amersham Pharmacia). Las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión resultantes se exponen en SEQ ID NO: 21 y 22.

Se dializaron las proteínas de fusión Fc-polipéptido similar a IL-17RB humano recombinante frente a tampón PBS durante 72 horas a 4°C usando una membrana Spectra/Pore con un MWCO de 10.000 (Spectrum Laboratories). Posteriormente, se sometieron a electroforesis las proteínas de fusión Fc-polipéptido similar a IL-17RB humano recombinante sobre un gel de acrilamida al 10% (Novex) y se tiñó con azul de Coomassie. Se exploró el gel teñido con un densitómetro para determinar el porcentaje de representación de la banda de proteína de interés. Se usó reactivo de ensayo de proteínas Lowry modificado (Pierce) para determinar la concentración de proteína total según las instrucciones del fabricante. Entonces, se calculó la cantidad de proteína de fusión Fc polipéptido similar a receptor de IL-17 humano multiplicando el porcentaje de proteínas de fusión Fc-polipéptido similar a IL-17RB por la concentración de proteína total.

Las proteínas de fusión de IL-17RB también pueden generarse con un péptido señal de Epogen (MGVHECPAWLLLLLSLPLGLPVLG (SEQ ID NO: 11) fusionado en marco en la proteína madura pronosticada en lugar de la fusión con el dominio extracelular nativo tal como se describió anteriormente.

EJEMPLO 8

El polipéptido similar a IL-17 se une al receptor B de IL-17

Para determinar si el polipéptido similar a IL-17 es un ligando para polipéptidos de receptor B de IL-17 (IL-17RB) (SEQ ID NO: 18 y 20), se realizaron ensayos de unión competitiva con la línea celular de linfoblastos B humanos GM3104A que se ha mostrado que expresa IL-17RB mediante análisis de transferencia de tipo Northern y RT-PCR. Se recogió el medio condicionado de las células 293E transfectadas para expresar la proteína de fusión Fc-polipéptido similar a IL-17 (descrito anteriormente en el ejemplo 6), se concentró y se usó para el ensayo de unión. Se determinó la especificidad de la unión al ligando mediante competición con receptores bloqueantes solubles, o bien IL-17RB-2 o bien IL-17RB-3. Se purificó la proteína de fusión Fc-IL-17R (que contenía la parte extracelular del receptor de IL-17) del medio condicionado recogido de las células 293E transfectadas. Se concentró (5x) el medio condicionado de las células 293E transfectadas con IL-17RB-2-Fc o IL-17-RB-3-Fc (depositados en la ATCC el 14 de marzo del 2001 con los números de registro _____ y _____ respectivamente) tal como se describió anteriormente en el ejemplo 7 con un instrumento Centracon de punto de corte de 3 Kd de Amicon (n.º 4203) y también se usó para bloquear.

Antes del ensayo de unión, se añadieron 0,5 ml de proteína de fusión Fc-polipéptido similar a IL-17 que contenía medio condicionado (1x) en viales que contenían cada uno 0,5 ml de medio condicionado 5x de IL-17RB-2-Fc, IL-17RB-3-Fc o 0,5 ml de proteína IL-17R-Fc 5 µg/ml en RPMI 1640. Se incubó cada vial sobre hielo durante 2 horas con el fin de bloquear previamente los sitios de unión no específica.

Posteriormente, se incubaron células GM3104A (1x10⁶ células por muestra) con 1 ml de FBS al 8%/PBS, a 4°C durante 1 hora. Entonces se lavaron las células con BSA al 0,5%/PBS y se incubaron con 1 ml de medio condicionado control, medio condicionado que contenía Fc-polipéptido similar a IL-17 o medio condicionado complementado con receptor bloqueante (IL-17RB-2 o IL-17RB-3) durante 2 horas a 4°C con agitación suave. Tras la incubación, se lavaron las células 3 veces con 1 ml de BSA al 0,5%/PBS enfriado con hielo.

Se tiñó cada muestra de células con 2 µg/100 µl de anticuerpo de cabra anti-IgG-Fc humano-FITC (Chemicon, AP113F) diluido en BSA al 0,5%/PBS. Se incubaron las células sobre hielo durante 1 hora y se lavaron 3 veces con 1 ml de BSA al 0,5%/PBS enfriado con hielo. Posteriormente, se detectó la unión al ligando con análisis de clasificador celular activado por fluorescencia usando FACScan (Becton Dickinson). Este análisis indicó que la proteína de fusión Fc-polipéptido similar a IL-17 se unía a células GM3104A. Esta unión se inhibía por IL-17RB-2 e IL-17RB-3 pero no IL-17 R.

EJEMPLO 9

El polipéptido similar a IL-17 induce la expresión de citocinas proinflamatorias

Se recogió el medio condicionado de células 293E que expresan o bien la proteína de fusión Fc-polipéptido similar a IL-17, IL-17B-Fc, IL-17C-Fc o bien IL-17C-Fc, para usarlo como ligando en el ensayo. Entonces se concentró el medio condicionado que contenía IL-17C-Fc, IL-17D-Fc e IL-17 like-Fc (15x) usando un instrumento Centracon de punto de corte de 3 Kd (Amicon, n.º 4032), y se reconstituyó hasta medio 1x añadiendo FBS al 20%/medio 1640 nuevo.

Se cultivaron células de linfoblastos T humanos (GM3104A, 1x10⁶ células/muestra) en medio condicionado concentrado reconstituido que contenía cada ligando de IL-17 (polipéptido similar a IL-17, IL-17B, IL-17 C, IL-17D y Fc humana). Tras la incubación durante 18 horas a 37°C y un 5% de CO₂, se recogió el medio y se midió la cantidad de IL-1α, IL-1β, IL-6, IFN-γ, G-CSF y TNF-α liberada al medio con el kit de inmunoensayo Quantikine apropiado (R&D Systems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se resumen en la tabla 4. La proteína de fusión Fc-polipéptido similar a IL-17 indujo la liberación de TNF-α, IL-1α e IL-6 en un grado mucho mayor que los otros ligandos de IL-17 sometidos a prueba. No se detectó inducción de IL-1β, IFN-γ y G-CSF para cualquiera de los ligandos.

Ligando	TNF-α (pg/ml)	IL-1α (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
MC simulado	190	6	157,6
Fc humana	210	8	199
IL-17B	180	11	138
IL-17C	170	8	152
IL-17D	180	22	155
Polipéptido similar a IL-17	460	25	362

EJEMPLO 10

Inmunofenotipado de la generación F1 de ratones transgénicos que sobreexpresan polipéptido similar a IL-17

Se analizó el inmunofenotipo de los ratones transgénicos que sobreexpresan el polipéptido similar a IL-17 usando análisis de FACS. Se midieron las poblaciones de CD5 en linfocitos CD19+ y CD34 en linfocitos CD19+ en los ganglios linfáticos de ratones transgénicos y control no transgénicos. Además, también se midió la expresión de CD4 expresión en eosinófilos en la médula ósea de ratones transgénicos y no transgénicos.

Se llevó a cabo análisis de FACS de los perfiles de expresión de CD5, CD34 y CD4 en células de los tejidos linfoides especificados aislados de ratones transgénicos que sobreexpresan polipéptido similar a IL-17 (8-10 semanas) y controles no transgénicos, en suspensiones celulares tal como se describe en el ejemplo 4. Se incubaron las células (1x10⁶) con 1 µg/10⁶ células de anticuerpos conjugados contra los siguientes marcadores de superficie de ratón: CD5-FITC, CD34-FITC, CD19-PE y CD4-Cychrome. Se obtuvieron todos los anticuerpos de BD-Pharmingen (San Diego, CA). Se realizaron los procedimientos de tinción tal como se describió anteriormente (véase el ejemplo 4) y se leyó en un instrumento FACScan (Beckman). Se midió el nivel de expresión de marcadores en compuertas de o bien linfocitos o bien eosinófilos (Eos) en gráficos de dispersión. (Véase la figura 21). Los porcentajes incluían la referencia a poblaciones dobles positivas.

Se representan en la tabla 5 los números absolutos de células para CD5+/CD19+, CD34+/CD19+ y CD4+Eos. Para medir los linfocitos, se realizó la separación mediante FACS de los linfocitos y se muestran los datos como el porcentaje del número absoluto de linfocitos. Para medir los eosinófilos, se realizó la separación mediante FACS de todos los tipos de células y por tanto se muestran los datos como el porcentaje del número total de células.

TABLA 5

Linfocitos	Porcentaje del número absoluto de linfocitos		Aumento en veces
	No transgénico	Transgénico	
CD5+CD19+ganglio linfático	0,97%	43,11%	aumento > 100 veces
CD34+CD19+ganglio linfático	1,39%	46,49%	aumento >90 veces

Eosinófilos	Porcentaje de células totales		Aumento en veces
	No transgénico	Transgénico	
CD4+Eos médula ósea	0,67%	15,14%	aumento >50 veces

- 5 Tal como se muestra en la tabla 5 anterior, los ratones transgénicos que sobreexpresan polipéptido similar a IL-17 F1 revelaron poblaciones linfocíticas y eosinofílicas que expresan marcadores hematopoyéticos que se han identificado en numerosas leucemias. Específicamente, los linfocitos CD19+ en el ganglio linfático de los ratones transgénicos expresaban los marcadores CD5 y CD34 que no se expresan en los ratones control. La expresión de tanto CD5 como CD34 presenta un aumento de aproximadamente 100 veces con respecto a los controles (tabla 5). Se ha identificado la regulación por incremento de CD5 y CD19 en leucemia crónica de células B (LCC-B), mientras que no se ha notificado la regulación por incremento de CD34 para leucemia mieloide aguda (LMA) {véase, Xia *et al.*, Cytometry 42: 114-7, 2000; Caldwell y Lascombe, Evaluation of Peripheral Blood Lymphocytosis, Academic Information Systems, Inc., 2000; Neuber *et al.*, Dermatology 192: 110-5, 1996).
- 10 Además, se encontró expresión de CD4 en eosinófilos en la médula ósea en los ratones transgénicos, con un aumento del 15% con respecto a los controles, lo que dio como resultado un aumento de 50 veces en los números absolutos de eosinófilos que expresan CD4. Esta expresión de CD4 aberrante en eosinófilos se ha notificado en pacientes con leucemia de células T adultos, con eosinófilos CD4+ y HLA-DR+ superiores que los grupos control (Sakamoto *et al.*, Intl. Archives of Allergy and Immunology. III (supl. 1): 26-8, 1996). A partir de estos patrones de
- 15 expresión, parece que el ganglio linfático en la generación F1 de ratones transgénicos que sobreexpresan polipéptido similar a IL-17 porta síntomas tempranos de estados preleucémicos. La salud de estos ratones puede deteriorarse a medida que envejecen, desarrollando cualquiera de estas posibles leucemias que pueden estar en estadios tempranos en estos ratones.
- 20 Estos resultados sugieren que polinucleótidos y polipéptidos similares a IL-17 pueden ser útiles en el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de linfomas incluyendo linfoma no Hodgkin y enfermedad de Hodgkin; leucemias mielógenas agudas (LMA y LMC) incluyendo leucemia premielocítica (LMA M3), leucemia mielomonocítica (LMA M4), eritroleucemia (LMA M6) y leucemia megacariocítica (LMA M7); leucemia linfocítica aguda incluyendo leucemia linfoblástica aguda; leucemia linfocítica crónica; leucemia de células pilosas; y mieloma múltiple.

Lista de secuencias

- 25 <110> Amgen, Inc.
 <120> Moléculas similares a IL-17 y usos de las mismas
- 30 <130> 01017/37128B
 <140>
 <141>
- 35 <150> 09/810.384
 <151> 16-03-2001
 <150> 60/266.159
 <151> 02-02-2001
- 40 <150> 60/213.125
 <151> 22-06-2000
 <160> 22
- 45 <170> PatentIn ver. 2.0
 <210> 1
 <211> 644
 <212> ADN
- 50 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (159) .. (641)
- 55 <400> 1

ES 2 444 710 T3

Met Tyr Gln Val Val Ala Phe Leu Ala Met Val Met Gly Thr His Thr
 1 5 10 15
 Tyr Ser His Trp Pro Ser Cys Cys Pro Ser Lys Gly Gln Asp Thr Ser
 20 25 30
 Glu Glu Leu Leu Arg Trp Ser Thr Val Pro Val Pro Pro Leu Glu Pro
 35 40 45
 Ala Arg Pro Asn Arg His Pro Glu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asp Gly
 50 55 60
 Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Glu Leu Asp Arg
 65 70 75 80
 Asp Leu Asn Arg Leu Pro Gln Asp Leu Tyr His Ala Arg Cys Leu Cys
 85 90 95
 Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr Gly Ser His Met Asp Pro Arg Gly
 100 105 110
 Asn Ser Glu Leu Leu Tyr His Asn Gln Thr Val Phe Tyr Arg Arg Pro
 115 120 125
 Cys His Gly Glu Lys Gly Thr His Lys Gly Tyr Cys Leu Glu Arg Arg
 130 135 140
 Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys Val Cys Val Arg Pro Arg Val Met
 145 150 155 160

Gly

<210> 3
 <211> 1013
 5 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1) .. (507)

<400> 3

ES 2 444 710 T3

atg tac cag gct gtt gca ttc ttg gca atg atc gtg gga acc cac acc 48
Met Tyr Gln Ala Val Ala Phe Leu Ala Met Ile Val Gly Thr His Thr
1 5 10 15

gtc agc ttg cgg atc cag gag ggc tgc agt cac ttg ccc agc tgc tgc 96
Val Ser Leu Arg Ile Gln Glu Gly Cys Ser His Leu Pro Ser Cys Cys
20 25 30

ccc agc aaa gag caa gaa ccc ccg gag gag tgg ctg aag tgg agc tct 144
Pro Ser Lys Glu Gln Glu Pro Pro Glu Glu Trp Leu Lys Trp Ser Ser
35 40 45

gca tct gtg tcc ccc cca gag cct ctg agc cac acc cac cac gca gaa 192
Ala Ser Val Ser Pro Pro Glu Pro Leu Ser His Thr His His Ala Glu
50 55 60

tcc tgc agg gcc agc aag gat ggc ccc ctc aac agc agg gcc atc tct 240
Ser Cys Arg Ala Ser Lys Asp Gly Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser
65 70 75 80

cct tgg agc tat gag ttg gac agg gac ttg aat cgg gtc ccc cag gac 288
Pro Trp Ser Tyr Glu Leu Asp Arg Asp Leu Asn Arg Val Pro Gln Asp
85 90 95

ctg tac cac gct cga tgc ctg tgc cca cac tgc gtc agc cta cag aca 336
Leu Tyr His Ala Arg Cys Leu Cys Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr
100 105 110

ggc tcc cac atg gac ccg ctg ggc aac tcc gtc cca ctt tac cac aac 384
Gly Ser His Met Asp Pro Leu Gly Asn Ser Val Pro Leu Tyr His Asn
115 120 125

cag acg gtc ttc tac cgg cgg cca tgc cat ggc gag gaa ggt acc cat 432
Gln Thr Val Phe Tyr Arg Arg Pro Cys His Gly Glu Glu Gly Thr His
130 135 140

cgc cgc tac tgc ttg gag cgc agg ctc tac cga gtc tcc ttg gct tgt 480
Arg Arg Tyr Cys Leu Glu Arg Arg Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys
145 150 155 160

gtg tgt gtg cgg ccc cgg gtc atg gct tagtcatgct caccacctgc 527
Val Cys Val Arg Pro Arg Val Met Ala
165

ctgaggctga tgcccggttg ggagagaggg ccagggtgtac aatcaccttg ccaatgcggg 587

ccgggttcaa gccctccaaa gccctacctg aagcagcagg ctcccgggac aagatggagg 647

acttggggag aaactctgac ttttgcactt tttggaagca cttttgggaa ggagcaggtt 707

ccgcttgctg tgctagagga tgctgttgctg gcatttctac tcaggaacgg actccaaagg 767

cctgctgacc ctggaagcca tactcctggc tcctttcccc tgaatcccc aactcctggc 827

acaggcactt tetccacctc tcccccttg ccttttgctg tgtttgcttg tgcattgcaa 887

ctctgcgtgc agccagggtg aattgccttg aaggatgggt ctgaggtgaa agctgttatc 947

gaaagtgaag agatttatcc aaataaacat ctgtgtttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1007

aaaaaa 1013

ES 2 444 710 T3

5 <210> 4
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 4

Met Tyr Gln Ala Val Ala Phe Leu Ala Met Ile Val Gly Thr His Thr
 1 5 10 15
 Val Ser Leu Arg Ile Gln Glu Gly Cys Ser His Leu Pro Ser Cys Cys
 20 25 30
 Pro Ser Lys Glu Gln Glu Pro Pro Glu Glu Trp Leu Lys Trp Ser Ser
 35 40 45
 Ala Ser Val Ser Pro Pro Glu Pro Leu Ser His Thr His His Ala Glu
 50 55 60
 Ser Cys Arg Ala Ser Lys Asp Gly Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser
 65 70 75 80
 Pro Trp Ser Tyr Glu Leu Asp Arg Asp Leu Asn Arg Val Pro Gln Asp
 85 90 95
 Leu Tyr His Ala Arg Cys Leu Cys Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr
 100 105 110
 Gly Ser His Met Asp Pro Leu Gly Asn Ser Val Pro Leu Tyr His Asn
 115 120 125
 Gln Thr Val Phe Tyr Arg Arg Pro Cys His Gly Glu Glu Gly Thr His
 130 135 140
 Arg Arg Tyr Cys Leu Glu Arg Arg Leu Tyr Arg Val Ser Leu Ala Cys
 145 150 155 160
 Val Cys Val Arg Pro Arg Val Met Ala
 165

10 <210> 5
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 5

Met Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Leu Glu Ala Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly
 20 25 30
 Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn
 35 40 45

ES 2 444 710 T3

Leu Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser
 50 55 60
 Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu
 65 70 75 80
 Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His
 85 90 95
 Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser
 100 105 110
 Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His
 115 120 125
 Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys
 130 135 140
 Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
 145 150 155

<210> 6
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 6
 Arg Asn Ile Glu Glu Met Val Ala Gln Leu Arg Asn Ser Ser Glu Leu
 1 5 10 15
 Ala Gln Arg Lys Cys Glu Val Asn Leu Gln Leu Trp Met Ser Asn Lys
 20 25 30
 Arg Ser Leu Ser Pro Trp Gly Tyr Ser Ile Asn His Asp Pro Ser Arg
 35 40 45
 Ile Pro Val Asp Leu Pro Glu Ala Arg Cys Leu Cys Leu Gly Cys Val
 50 55 60
 Asn Pro Phe Thr Met Gln Glu Asp Arg Ser Met Val Ser Val Pro Val
 65 70 75 80
 Phe Ser Gln Val Pro Val Arg Arg Arg Leu Cys Pro Pro Pro Pro Arg
 85 90 95
 Thr Gly Pro Cys Arg Gln Arg Ala Val Met Glu Thr Ile Val Ala Gly
 100 105 110
 Cys Thr Cys Ile Phe
 115

<210> 7
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

15

<400> 7

ES 2 444 710 T3

Arg Asn Ile Glu Glu Met Val Ala Gln Leu Arg Asn Ser Ser Glu Leu
 1 5 10 15
 Ala Gln Arg Lys Cys Glu Val Asn Leu Gln Leu Trp Met Ser Asn Lys
 20 25 30
 Arg Ser Leu Ser Pro Trp Gly Tyr Ser Ile Asn His Asp Pro Ser Arg
 35 40 45
 Ile Pro Val Asp Leu Pro Glu Ala Arg Cys Leu Cys Leu Gly Cys Val
 50 55 60
 Asn Pro Phe Thr Met Gln Glu Asp Arg Ser Met Val Ser Val Pro Val
 65 70 75 80
 Phe Ser Gln Val Pro Val Arg Arg Arg Leu Cys Pro Pro Pro Pro Arg
 85 90 95
 Thr Gly Pro Cys Arg Gln Arg Ala Val Met Glu Thr Ile Ala Val Gly
 100 105 110
 Cys Thr Cys Ile Phe
 115

- <210> 8
- 5 <211> 197
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 8

ES 2 444 710 T3

Met Thr Leu Leu Pro Gly Leu Leu Phe Leu Thr Trp Leu His Thr Cys
 1 5 10 15
 Leu Ala His His Asp Pro Ser Leu Arg Gly His Pro His Ser His Gly
 20 25 30
 Thr Pro His Cys Tyr Ser Ala Glu Glu Leu Pro Leu Gly Gln Ala Pro
 35 40 45
 Pro His Leu Leu Ala Arg Gly Ala Lys Trp Gly Gln Ala Leu Pro Val
 50 55 60
 Ala Leu Val Ser Ser Leu Glu Ala Ala Ser His Arg Gly Arg His Glu
 65 70 75 80
 Arg Pro Ser Ala Thr Thr Gln Cys Pro Val Leu Arg Pro Glu Glu Val
 85 90 95
 Leu Glu Ala Asp Thr His Gln Arg Ser Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Arg
 100 105 110
 Val Asp Thr Asp Glu Asp Arg Tyr Pro Gln Lys Leu Ala Phe Ala Glu
 115 120 125
 Cys Leu Cys Arg Gly Cys Ile Asp Ala Arg Thr Gly Arg Glu Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Asn Ser Val Arg Leu Leu Gln Ser Leu Leu Val Leu Arg Arg
 145 150 155 160
 Arg Pro Cys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Leu Pro Thr Pro Gly Ala Phe
 165 170 175
 Ala phe His Thr Glu Phe Ile His Val Pro Val Gly Cys Thr Cys Val
 180 185 190
 Leu Pro Arg Ser Val
 195

- <210> 9
- 5 <211> 1496
- <212> ADN
- <213> *Mus musculus*
- <220>
- 10 <221> CDS
- <222> (511) .. (987)
- <400> 9

ES 2 444 710 T3

```

ccgggcaggt gccctcggcg cgtcccaaag cttaggggaag ctccaggtgt cttgggaaat 60
gaagaaaaag gccaccgagc aaaaaggaac agagaagggg aggagcagtg ctgtgggctc 120
gcctagggtc gagggccatt atcacctaca aatcagaatg tgggagtgct attctagagg 180
tctccatctt tgccattgct gggtcgctca gaaaagtgtg atggggttgt cccattgcca 240
agaacagctt ctgcttacca gcaggtgctg acctctttcc ccagaggcac agggaaggaa 300
ttccagcccc ggttggctgc cagaggcttc ctctggcggt gggtacagag gcagagaaag 360
aaaccccaaa tgtctcctat gaaaaacaat gtccccgtca tccaggccag atcattctgc 420
agtgtcaaca gttgagacaa gaagctgggg tcattttctg tgcctaagag tgcctgttct 480
gcactggcca aggctgttgc attcttggca atg atc gtg gga acc cac acc gtc 534
                               Met Ile Val Gly Thr His Thr Val
                               1                               5

agc ttg cgg atc cag gag ggc tgc agt cac ttg ccc agc tgc tgc ccc 582
Ser Leu Arg Ile Gln Glu Gly Cys Ser His Leu Pro Ser Cys Cys Pro
   10                               15                               20

agc aaa gag caa gaa ccc ccg gag gag tgg ctg aag tgg agc tct gca 630
Ser Lys Glu Gln Glu Pro Pro Glu Glu Trp Leu Lys Trp Ser Ser Ala
   25                               30                               35                               40

tct gtg tcc ccc cca gag cct ctg agc cac acc cac cac gca gaa tcc 678
Ser Val Ser Pro Pro Glu Pro Leu Ser His Thr His His Ala Glu Ser
                               45                               50                               55

tgc agg gcc agc aag gat ggc ccc ctc aac agc agg gcc atc tct cct 726
Cys Arg Ala Ser Lys Asp Gly Pro Leu Asn Ser Arg Ala Ile Ser Pro
                               60                               65                               70

tgg agc tat gag ttg gac agg gac ttg aat cgg gtc ccc cag gac ctg 774
Trp Ser Tyr Glu Leu Asp Arg Asp Leu Asn Arg Val Pro Gln Asp Leu
   75                               80                               85

tac cac gct cga tgc ctg tgc cca cac tgc gtc agc cta cag aca ggc 822
Tyr His Ala Arg Cys Leu Cys Pro His Cys Val Ser Leu Gln Thr Gly
   90                               95                               100

tcc cac atg gac ccg ctg ggc aac tcc gtc cca ctt tac cac aac cag 870
Ser His Met Asp Pro Leu Gly Asn Ser Val Pro Leu Tyr His Asn Gln
  105                               110                               115                               120

```


ES 2 444 710 T3

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

5 <210> 11
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido señal de Epogen

<400> 11
 Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly
 20 25

15 <210> 12
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de fragmento Fc

<400> 12

ES 2 444 710 T3

Glu Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 165 170 175
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 180 185 190
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 195 200 205
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 210 215 220
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

5 <210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido de proteína TAT de VIH

<400> 13
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

ES 2 444 710 T3

ataaaagcgc agcgtgcggg tggcctggat cccgcgcagt ggcccggcg atg tcg ctc 58
Met Ser Leu
1

gtg ctg cta agc ctg gcc gcg ctg tgc agg agc gcc gta ccc cga gag 106
Val Leu Leu Ser Leu Ala Ala Leu Cys Arg Ser Ala Val Pro Arg Glu
5 10 15

ccg acc gtt caa tgt ggc tct gaa act ggg cca tct cca gag tgg atg 154
Pro Thr Val Gln Cys Gly Ser Glu Thr Gly Pro Ser Pro Glu Trp Met
20 25 30 35

cta caa cat gat cta atc ccc gga gac ttg agg gac ctc cga gta gaa 202
Leu Gln His Asp Leu Ile Pro Gly Asp Leu Arg Asp Leu Arg Val Glu
40 45 50

cct gtt aca act agt gtt gca aca ggg gac tat tca att ttg atg aat 250
Pro Val Thr Thr Ser Val Ala Thr Gly Asp Tyr Ser Ile Leu Met Asn
55 60 65

gta agc tgg gta ctc cgg gca gat gcc agc atc cgc ttg ttg aag gcc 298
Val Ser Trp Val Leu Arg Ala Asp Ala Ser Ile Arg Leu Leu Lys Ala
70 75 80

acc aag att tgt gtg acg ggc aaa agc aac ttc cag tcc tac agc tgt 346
Thr Lys Ile Cys Val Thr Gly Lys Ser Asn Phe Gln Ser Tyr Ser Cys
85 90 95

gtg agg tgc aat tac aca gag gcc ttc cag act cag acc aga ccc tct 394
Val Arg Cys Asn Tyr Thr Glu Ala Phe Gln Thr Gln Thr Arg Pro Ser
100 105 110 115

ggt ggt aaa tgg aca ttt tcc tac atc ggc ttc cct gta gag ctg aac 442
Gly Gly Lys Trp Thr Phe Ser Tyr Ile Gly Phe Pro Val Glu Leu Asn
120 125 130

aca gtc tat ttc att ggg gcc cat aat att cct aat gca aat atg aat 490
Thr Val Tyr Phe Ile Gly Ala His Asn Ile Pro Asn Ala Asn Met Asn
135 140 145

gaa gat ggc cct tcc atg tct gtg aat ttc acc tca cca ggc tgc cta 538
Glu Asp Gly Pro Ser Met Ser Val Asn Phe Thr Ser Pro Gly Cys Leu
150 155 160

ES 2 444 710 T3

gac Asp 165	cac His 165	ata Ile	atg Met	aaa Lys	tat Tyr	aaa Lys	aaa Lys	aag Lys	tgt Cys	gtc Val	aag Lys	gcc Ala	gga Gly	agc Ser	ctg Leu	586
tgg Trp 180	gat Asp	ccg Pro	aac Asn	atc Ile	act Thr	gct Ala	tgt Cys	aag Lys	aag Lys	aat Asn	gag Glu	gag Glu	aca Thr	gta Val	gaa Glu	634
gtg Val	aac Asn	ttc Phe	aca Thr	acc Thr	act Thr	ccc Pro	ctg Leu	gga Gly	aac Asn	aga Arg	tac Tyr	atg Met	gct Ala	ctt Leu	atc Ile	682
caa Gln	cac His	agc Ser	act Thr	atc Ile	atc Ile	ggg Gly	ttt Phe	tct Ser	cag Gln	gtg Val	ttt Phe	gag Glu	cca Pro	cac His	cag Gln	730
aag Lys	aaa Lys	caa Gln	acg Thr	cga Arg	gct Ala	tca Ser	gtg Val	gtg Val	att Ile	cca Pro	gtg Val	act Thr	ggg Gly	gat Asp	agt Ser	778
gaa Glu	ggg Gly	gct Ala	acg Thr	gtg Val	cag Gln	ctg Leu	act Thr	cca Pro	tat Tyr	ttt Phe	cct Pro	act Thr	tgt Cys	ggc Gly	agc Ser	826
gac Asp 260	tgc Cys	atc Ile	cga Arg	cat His	aaa Lys	gga Gly	aca Thr	ggt Val	gtg Val	ctc Leu	tgc Cys	cca Pro	caa Gln	aca Thr	ggc Gly	874
gtc Val	cct Pro	ttc Phe	cct Pro	ctg Leu	gat Asp	aac Asn	aac Asn	aaa Lys	agc Ser	aag Lys	ccg Pro	gga Gly	ggc Gly	tgg Trp	ctg Leu	922
cct Pro	ctc Leu	ctc Leu	ctg Leu	ctg Leu	tct Ser	ctg Leu	ctg Leu	gtg Val	gcc Ala	aca Thr	tgg Trp	gtg Val	ctg Leu	gtg Val	gca Ala	970
ggg Gly	atc Ile	tat Tyr	cta Leu	atg Met	tgg Trp	agg Arg	cac His	gaa Glu	agg Arg	atc Ile	aag Lys	aag Lys	act Thr	tcc Ser	ttt Phe	1018
tct Ser	acc Thr	acc Thr	aca Thr	cta Leu	ctg Leu	ccc Pro	ccc Pro	att Ile	aag Lys	ggt Val	ctt Leu	gtg Val	ggt Val	tac Tyr	cca Pro	1066
tct Ser 340	gaa Glu	ata Ile	tgt Cys	ttc Phe	cat His	cac His	aca Thr	att Ile	tgt Cys	tac Tyr	ttc Phe	act Thr	gaa Glu	ttt Phe	ctt Leu	1114
caa Gln	aac Asn	cat His	tgc Cys	aga Arg	agt Ser	gag Glu	gtc Val	atc Ile	ctc Leu	gaa Glu	aag Lys	tgg Trp	cag Gln	aaa Lys	aag Lys	1162
aaa Lys	ata Ile	gca Ala	gag Glu	atg Met	ggg Gly	cca Pro	gtg Val	cag Gln	tgg Trp	ctt Leu	gcc Ala	act Thr	caa Gln	aag Lys	aag Lys	1210
gca Ala	gca Ala	gac Asp	aaa Lys	gtc Val	gtc Val	ttc Phe	ctt Leu	ctt Leu	tcc Ser	aat Asn	gac Asp	gtc Val	aac Asn	agt Ser	gtg Val	1258

ES 2 444 710 T3

tgc gat ggt acc tgt ggc aag agc gag ggc agt ccc agt gag aac tct	1306
Cys Asp Gly Thr Cys Gly Lys Ser Glu Gly Ser Pro Ser Glu Asn Ser	
405 410 415	
caa gac ctc ttc ccc ctt gcc ttt aac ctt ttc tgc agt gat cta aga	1354
Gln Asp Leu Phe Pro Leu Ala Phe Asn Leu Phe Cys Ser Asp Leu Arg	
420 425 430 435	
agc cag att cat ctg cac aaa tac gtg gtg gtc tac ttt aga gag att	1402
Ser Gln Ile His Leu His Lys Tyr Val Val Val Tyr Phe Arg Glu Ile	
440 445 450	
gat aca aaa gac gat tac aat gct ctc agt gtc tgc ccc aag tac cac	1450
Asp Thr Lys Asp Asp Tyr Asn Ala Leu Ser Val Cys Pro Lys Tyr His	
455 460 465	
ctc atg aag gat gcc act gct ttc tgt gca gaa ctt ctc cat gtc aag	1498
Leu Met Lys Asp Ala Thr Ala Phe Cys Ala Glu Leu Leu His Val Lys	
470 475 480	
cag cag gtg tca gca gga aaa aga tca caa gcc tgc cac gat ggc tgc	1546
Gln Gln Val Ser Ala Gly Lys Arg Ser Gln Ala Cys His Asp Gly Cys	
485 490 495	
tgc tcc ttg tagccacccc atgagaagca agagacctta aaggcttcct	1595
Cys Ser Leu	
500	
atcccaccaa ttacagggaa aaaacgtgtg atgatcctga agcttactat gcagcctaca	1655
aacagcctta gtaattaa cttttatcac caataaaatt ttcaaatatt gctaactaat	1715
gtagcattaa ctaacgattg gaaactacat ttacaacttc aaagctggtt tatacataga	1775
aatcaattac agctttaatt gaaaactgta accattttga taatgcaaca ataaagcatc	1835
ttcagc	1841

<210> 18
 <211> 502
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 18

ES 2 444 710 T3

Met Ser Leu Val Leu Leu Ser Leu Ala Ala Leu Cys Arg Ser Ala Val
 1 5 10 15

Pro Arg Glu Pro Thr Val Gln Cys Gly Ser Glu Thr Gly Pro Ser Pro
 20 25 30

Glu Trp Met Leu Gln His Asp Leu Ile Pro Gly Asp Leu Arg Asp Leu
 35 40 45

Arg Val Glu Pro Val Thr Thr Ser Val Ala Thr Gly Asp Tyr Ser Ile
 50 55 60

Leu Met Asn Val Ser Trp Val Leu Arg Ala Asp Ala Ser Ile Arg Leu
 65 70 75 80

Leu Lys Ala Thr Lys Ile Cys Val Thr Gly Lys Ser Asn Phe Gln Ser
 85 90 95

ES 2 444 710 T3

Tyr Ser Cys Val Arg Cys Asn Tyr Thr Glu Ala Phe Gln Thr Gln Thr
 100 105 110
 Arg Pro Ser Gly Gly Lys Trp Thr Phe Ser Tyr Ile Gly Phe Pro Val
 115 120 125
 Glu Leu Asn Thr Val Tyr Phe Ile Gly Ala His Asn Ile Pro Asn Ala
 130 135 140
 Asn Met Asn Glu Asp Gly Pro Ser Met Ser Val Asn Phe Thr Ser Pro
 145 150 155 160
 Gly Cys Leu Asp His Ile Met Lys Tyr Lys Lys Lys Cys Val Lys Ala
 165 170 175
 Gly Ser Leu Trp Asp Pro Asn Ile Thr Ala Cys Lys Lys Asn Glu Glu
 180 185 190
 Thr Val Glu Val Asn Phe Thr Thr Thr Pro Leu Gly Asn Arg Tyr Met
 195 200 205
 Ala Leu Ile Gln His Ser Thr Ile Ile Gly Phe Ser Gln Val Phe Glu
 210 215 220
 Pro His Gln Lys Lys Gln Thr Arg Ala Ser Val Val Ile Pro Val Thr
 225 230 235 240
 Gly Asp Ser Glu Gly Ala Thr Val Gln Leu Thr Pro Tyr Phe Pro Thr
 245 250 255
 Cys Gly Ser Asp Cys Ile Arg His Lys Gly Thr Val Val Leu Cys Pro
 260 265 270
 Gln Thr Gly Val Pro Phe Pro Leu Asp Asn Asn Lys Ser Lys Pro Gly
 275 280 285
 Gly Trp Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Val Ala Thr Trp Val
 290 295 300
 Leu Val Ala Gly Ile Tyr Leu Met Trp Arg His Glu Arg Ile Lys Lys
 305 310 315 320
 Thr Ser Phe Ser Thr Thr Thr Leu Leu Pro Pro Ile Lys Val Leu Val
 325 330 335
 Val Tyr Pro Ser Glu Ile Cys Phe His His Thr Ile Cys Tyr Phe Thr
 340 345 350
 Glu Phe Leu Gln Asn His Cys Arg Ser Glu Val Ile Leu Glu Lys Trp
 355 360 365
 Gln Lys Lys Lys Ile Ala Glu Met Gly Pro Val Gln Trp Leu Ala Thr
 370 375 380
 Gln Lys Lys Ala Ala Asp Lys Val Val Phe Leu Leu Ser Asn Asp Val
 385 390 395 400
 Asn Ser Val Cys Asp Gly Thr Cys Gly Lys Ser Glu Gly Ser Pro Ser
 405 410 415
 Glu Asn Ser Gln Asp Leu Phe Pro Leu Ala Phe Asn Leu Phe Cys Ser
 420 425 430

ES 2 444 710 T3

act	gca	ggc	gtg	ggc	cac	cag	acc	tgg	cta	att	ttt	gta	gtt	ttt	gta	490
Thr	Ala	Gly	Val	Gly	His	Gln	Thr	Trp	Leu	Ile	Phe	Val	Val	Phe	Val	
			135					140					145			
gag	ggg	ggt	ttc	acc	gtg	ttg	ctg	gtc	ttg	aat	tcc	agt	gct	cag	gcg	538
Glu	Gly	Gly	Phe	Thr	Val	Leu	Leu	Val	Leu	Asn	Ser	Ser	Ala	Gln	Ala	
		150					155					160				
atc	tgc	ctg	cct	cgg	ctt	ccc	aaa	gtg	ctg	gga	tta	cag	tgg	aca	ttt	586
Ile	Cys	Leu	Pro	Arg	Leu	Pro	Lys	Val	Leu	Gly	Leu	Gln	Trp	Thr	Phe	
	165					170					175					
tcc	tac	atc	ggc	ttc	cct	gta	gag	ctg	aac	aca	gtc	tat	ttc	att	ggg	634
Ser	Tyr	Ile	Gly	Phe	Pro	Val	Glu	Leu	Asn	Thr	Val	Tyr	Phe	Ile	Gly	
180					185					190					195	
gcc	cat	aat	att	cct	aat	gca	aat	atg	aat	gaa	gat	ggc	cct	tcc	atg	682
Ala	His	Asn	Ile	Pro	Asn	Ala	Asn	Met	Asn	Glu	Asp	Gly	Pro	Ser	Met	
				200				205						210		
tct	gtg	aat	ttc	acc	tca	cca	ggc	tgc	cta	gac	cac	ata	atg	aaa	tat	730
Ser	Val	Asn	Phe	Thr	Ser	Pro	Gly	Cys	Leu	Asp	His	Ile	Met	Lys	Tyr	
			215					220					225			
aaa	aaa	aag	tgt	gtc	aag	gcc	gga	agc	ctg	tgg	gat	ccg	aac	atc	act	778
Lys	Lys	Lys	Cys	Val	Lys	Ala	Gly	Ser	Leu	Trp	Asp	Pro	Asn	Ile	Thr	
		230					235					240				
gct	tgt	aag	aag	aat	gag	gag	aca	gta	gaa	gtg	aac	ttc	aca	acc	act	826
Ala	Cys	Lys	Lys	Asn	Glu	Glu	Thr	Val	Glu	Val	Asn	Phe	Thr	Thr	Thr	
	245					250					255					
ccc	ctg	gga	aac	aga	tac	atg	gct	ctt	atc	caa	cac	agc	act	atc	atc	874
Pro	Leu	Gly	Asn	Arg	Tyr	Met	Ala	Leu	Ile	Gln	His	Ser	Thr	Ile	Ile	
260				265						270					275	
ggg	ttt	tct	cag	gtg	ttt	gag	cca	cac	cag	aag	aaa	caa	acg	cga	gct	922
Gly	Phe	Ser	Gln	Val	Phe	Glu	Pro	His	Gln	Lys	Lys	Gln	Thr	Arg	Ala	
			280						285					290		
tca	gtg	gtg	att	cca	gtg	act	ggg	gat	agt	gaa	ggt	gct	acg	gtg	cag	970
Ser	Val	Val	Ile	Pro	Val	Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Gly	Ala	Thr	Val	Gln	
			295					300					305			
ctg	act	cca	tat	ttt	cct	act	tgt	ggc	agc	gac	tgc	atc	cga	cat	aaa	1018
Leu	Thr	Pro	Tyr	Phe	Pro	Thr	Cys	Gly	Ser	Asp	Cys	Ile	Arg	His	Lys	
		310					315					320				
gga	aca	gtt	gtg	ctc	tgc	cca	caa	aca	ggc	gtc	cct	ttc	cct	ctg	gat	1066
Gly	Thr	Val	Val	Leu	Cys	Pro	Gln	Thr	Gly	Val	Pro	Phe	Pro	Leu	Asp	
	325					330					335					
aac	aac	aaa	agc	aag	ccg	gga	ggc	tgg	ctg	cct	ctc	ctc	ctg	ctg	tct	1114
Asn	Asn	Lys	Ser	Lys	Pro	Gly	Gly	Trp	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	
340					345					350					355	
ctg	ctg	gtg	gcc	aca	tgg	gtg	ctg	gtg	gca	ggg	atc	tat	cta	atg	tgg	1162
Leu	Leu	Val	Ala	Thr	Trp	Val	Leu	Val	Ala	Gly	Ile	Tyr	Leu	Met	Trp	
			360						365					370		
agg	cac	gaa	agg	atc	aag	aag	act	tcc	ttt	tct	acc	acc	aca	cta	ctg	1210
Arg	His	Glu	Arg	Ile	Lys	Lys	Thr	Ser	Phe	Ser	Thr	Thr	Thr	Leu	Leu	
			375					380						385		

ES 2 444 710 T3

```

ccc ccc att aag gtt ctt gtg gtt tac cca tct gaa ata tgt ttc cat 1258
Pro Pro Ile Lys Val Leu Val Val Tyr Pro Ser Glu Ile Cys Phe His
      390                               395                               400

cac aca att tgt tac ttc act gaa ttt ctt caa aac cat tgc aga agt 1306
His Thr Ile Cys Tyr Phe Thr Glu Phe Leu Gln Asn His Cys Arg Ser
      405                               410                               415

gag gtc atc ctc gaa aag tgg cag aaa aag aaa ata gca gag atg ggt 1354
Glu Val Ile Leu Glu Lys Trp Gln Lys Lys Lys Ile Ala Glu Met Gly
420                               425                               430

cca gtg cag tgg ctt gcc act caa aag aag gca gca gac aaa gtc gtc 1402
Pro Val Gln Trp Leu Ala Thr Gln Lys Lys Ala Ala Asp Lys Val Val
      440                               445                               450

ttc ctt ctt tcc aat gac gtc aac agt gtg tgc gat ggt acc tgt ggc 1450
Phe Leu Leu Ser Asn Asp Val Asn Ser Val Cys Asp Gly Thr Cys Gly
      455                               460                               465

aag agc gag ggc agt ccc agt gag aac tct caa gac ctc ttc ccc ctt 1498
Lys Ser Glu Gly Ser Pro Ser Glu Asn Ser Gln Asp Leu Phe Pro Leu
      470                               475                               480

gcc ttt aac ctt ttc tgc agt gat cta aga agc cag att cat ctg cac 1546
Ala Phe Asn Leu Phe Cys Ser Asp Leu Arg Ser Gln Ile His Leu His
      485                               490                               495

aaa tac gtg gtg gtc tac ttt aga gag att gat aca aaa gac gat tac 1594
Lys Tyr Val Val Val Tyr Phe Arg Glu Ile Asp Thr Lys Asp Asp Tyr
500                               505                               510

aat gct ctc agt gtc tgc ccc aag tac cac ctc atg aag gat gcc act 1642
Asn Ala Leu Ser Val Cys Pro Lys Tyr His Leu Met Lys Asp Ala Thr
      520                               525                               530

gct ttc tgt gca gaa ctt ctc cat gtc aag cag cag gtg tca gca gga 1690
Ala Phe Cys Ala Glu Leu Leu His Val Lys Gln Gln Val Ser Ala Gly
      535                               540                               545

aaa aga tca caa gcc tgc cac gat ggc tgc tgc tcc ttg tagccccccc 1739
Lys Arg Ser Gln Ala Cys His Asp Gly Cys Cys Ser Leu
      550                               555                               560

atgagaagca agagacctta aaggcttccct atccccaccaa ttacaggggaa aaaacgtgtg 1799

atgatcctga agcttactat gcagcctaca aacagcctta gtaattaaaa cattttatac 1859

caataaaatt ttcaaatatt gctaactaat gtagcattaa ctaacgattg gaaactacat 1919

ttacaacttc aaagctgttt tatacataga aatcaattac agctttaatt gaaaactgta 1979

accattttga taatgcaaca ataaagcatc ttcagc 2015

```

<210> 20
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 20

ES 2 444 710 T3

Met Ser Leu Val Leu Leu Ser Leu Ala Ala Leu Cys Arg Ser Ala Val
 1 5 10 15

Pro Arg Glu Pro Thr Val Gln Cys Gly Ser Glu Thr Gly Pro Ser Pro
 20 25 30

Glu Trp Met Leu Gln His Asp Leu Ile Pro Gly Asp Leu Arg Asp Leu
 35 40 45

Arg Val Glu Pro Val Thr Thr Ser Val Ala Thr Gly Asp Tyr Ser Ile
 50 55 60

Leu Met Asn Val Ser Trp Val Leu Arg Ala Asp Ala Ser Ile Arg Leu
 65 70 75 80

Leu Lys Ala Thr Lys Ile Cys Val Thr Gly Lys Ser Asn Phe Gln Ser
 85 90 95

Tyr Ser Cys Val Arg Leu Glu Cys Ser Gly Ala Ile Met Ala Arg Cys
 100 105 110

Asp Leu Asn Leu Leu Gly Ser Ser Asp Arg Ser Ala Ser Ala Ser Arg
 115 120 125

Ala Ala Gly Thr Ala Gly Val Gly His Gln Thr Trp Leu Ile Phe Val
 130 135 140

Val Phe Val Glu Gly Gly Phe Thr Val Leu Leu Val Leu Asn Ser Ser
 145 150 155 160

Ala Gln Ala Ile Cys Leu Pro Arg Leu Pro Lys Val Leu Gly Leu Gln
 165 170 175

Trp Thr Phe Ser Tyr Ile Gly Phe Pro Val Glu Leu Asn Thr Val Tyr.
 180 185 190

Phe Ile Gly Ala His Asn Ile Pro Asn Ala Asn Met Asn Glu Asp Gly
 195 200 205

Pro Ser Met Ser Val Asn Phe Thr Ser Pro Gly Cys Leu Asp His Ile
 210 215 220

Met Lys Tyr Lys Lys Lys Cys Val Lys Ala Gly Ser Leu Trp Asp Pro
 225 230 235 240

Asn Ile Thr Ala Cys Lys Lys Asn Glu Glu Thr Val Glu Val Asn Phe
 245 250 255

Thr Thr Thr Pro Leu Gly Asn Arg Tyr Met Ala Leu Ile Gln His Ser
 260 265 270

Thr Ile Ile Gly Phe Ser Gln Val Phe Glu Pro His Gln Lys Lys Gln
 275 280 285

Thr Arg Ala Ser Val Val Ile Pro Val Thr Gly Asp Ser Glu Gly Ala
 290 295 300

Thr Val Gln Leu Thr Pro Tyr Phe Pro Thr Cys Gly Ser Asp Cys Ile
 305 310 315 320

Arg His Lys Gly Thr Val Val Leu Cys Pro Gln Thr Gly Val Pro Phe
 325 330 335

ES 2 444 710 T3

Pro Leu Asp Asn Asn Lys Ser Lys Pro Gly Gly Trp Leu Pro Leu Leu
340 345 350

Leu Leu Ser Leu Leu Val Ala Thr Trp Val Leu Val Ala Gly Ile Tyr
355 360 365

Leu Met Trp Arg His Glu Arg Ile Lys Lys Thr Ser Phe Ser Thr Thr
370 375 380

Thr Leu Leu Pro Pro Ile Lys Val Leu Val Val Tyr Pro Ser Glu Ile
385 390 395 400

Cys Phe His His Thr Ile Cys Tyr Phe Thr Glu Phe Leu Gln Asn His
405 410 415

Cys Arg Ser Glu Val Ile Leu Glu Lys Trp Gln Lys Lys Lys Ile Ala
420 425 430

Glu Met Gly Pro Val Gln Trp Leu Ala Thr Gln Lys Lys Ala Ala Asp
435 440 445

Lys Val Val Phe Leu Leu Ser Asn Asp Val Asn Ser Val Cys Asp Gly
450 455 460

Thr Cys Gly Lys Ser Glu Gly Ser Pro Ser Glu Asn Ser Gln Asp Leu
465 470 475 480

Phe Pro Leu Ala Phe Asn Leu Phe Cys Ser Asp Leu Arg Ser Gln Ile
485 490 495

His Leu His Lys Tyr Val Val Val Tyr Phe Arg Glu Ile Asp Thr Lys
500 505 510

Asp Asp Tyr Asn Ala Leu Ser Val Cys Pro Lys Tyr His Leu Met Lys
515 520 525

Asp Ala Thr Ala Phe Cys Ala Glu Leu Leu His Val Lys Gln Gln Val
530 535 540

Ser Ala Gly Lys Arg Ser Gln Ala Cys His Asp Gly Cys Cys Ser Leu
545 550 555 560

<210> 21
<211> 521
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

ES 2 444 710 T3

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

ES 2 444 710 T3

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 420 425 430

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 435 440 445

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 450 455 460

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 465 470 475 480

Phe Phe Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 485 490 495

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 500 505 510

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 515 520

<210> 22

<211> 585

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

ES 2 444 710 T3

Met Ser Leu Val Leu Leu Ser Leu Ala Ala Leu Cys Arg Ser Ala Val
 1 5 10 15

Pro Arg Glu Pro Thr Val Gln Cys Gly Ser Glu Thr Gly Pro Ser Pro
 20 25 30

Glu Trp Met Leu Gln His Asp Leu Ile Pro Gly Asp Leu Arg Asp Leu
 35 40 45

Arg Val Glu Pro Val Thr Thr Ser Val Ala Thr Gly Asp Tyr Ser Ile
 50 55 60

Leu Met Asn Val Ser Trp Val Leu Arg Ala Asp Ala Ser Ile Arg Leu
 65 70 75 80

Leu Lys Ala Thr Lys Ile Cys Val Thr Gly Lys Ser Asn Phe Gln Ser
 85 90 95

Tyr Ser Cys Val Arg Leu Glu Cys Ser Gly Ala Ile Met Ala Arg Cys
 100 105 110

Asp Leu Asn Leu Leu Gly Ser Ser Asp Arg Ser Ala Ser Ala Ser Arg
 115 120 125

Ala Ala Gly Thr Ala Gly Val Gly His Gln Thr Trp Leu Ile Phe Val
 130 135 140

Val Phe Val Glu Gly Gly Phe Thr Val Leu Leu Val Leu Asn Ser Ser
 145 150 155 160

Ala Gln Ala Ile Cys Leu Pro Arg Leu Pro Lys Val Leu Gly Leu Gln
 165 170 175

Trp Thr Phe Ser Tyr Ile Gly Phe Pro Val Glu Leu Asn Thr Val Tyr
 180 185 190

ES 2 444 710 T3

Phe Ile Gly Ala His Asn Ile Pro Asn Ala Asn Met Asn Glu Asp Gly
 195 200 205
 Pro Ser Met Ser Val Asn Phe Thr Ser Pro Gly Cys Leu Asp His Ile
 210 215 220
 Met Lys Tyr Lys Lys Lys Cys Val Lys Ala Gly Ser Leu Trp Asp Pro
 225 230 235 240
 Asn Ile Thr Ala Cys Lys Lys Asn Glu Glu Thr Val Glu Val Asn Phe
 245 250 255
 Thr Thr Thr Pro Leu Gly Asn Arg Tyr Met Ala Leu Ile Gln His Ser
 260 265 270
 Thr Ile Ile Gly Phe Ser Gln Val Phe Glu Pro His Gln Lys Lys Gln
 275 280 285
 Thr Arg Ala Ser Val Val Ile Pro Val Thr Gly Asp Ser Glu Gly Ala
 290 295 300
 Thr Val Gln Leu Thr Pro Tyr Phe Pro Thr Cys Gly Ser Asp Cys Ile
 305 310 315 320
 Arg His Lys Gly Thr Val Val Leu Cys Pro Gln Thr Gly Val Pro Phe
 325 330 335
 Pro Leu Asp Asn Asn Lys Ser Lys Pro Gly Gly Trp Leu Pro Ala Ala
 340 345 350
 Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 355 360 365
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 370 375 380
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 385 390 395 400
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 405 410 415
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 420 425 430
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 435 440 445
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 450 455 460
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 465 470 475 480
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 485 490 495
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 500 505 510
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 515 520 525

ES 2 444 710 T3

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
530 535 540

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
545 550 555 560

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
565 570 575

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
580 585

REIVINDICACIONES

1. Uso de un anticuerpo antagonista específico para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma que comprende 25, 50, 75, 100 ó 150 aminoácidos contiguos, para la preparación de un medicamento para tratar fibrosis quística, síndrome de enfermedad respiratoria aguda o enfisema.
5
2. Anticuerpo antagonista específico para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma que comprende 25, 50, 75, 100 ó 150 aminoácidos contiguos, para su uso en el tratamiento de fibrosis quística, síndrome de enfermedad respiratoria aguda o enfisema.
3. Uso de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista específico para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma que comprende 25, 50, 75, 100 ó 150 aminoácidos contiguos, y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable, para la preparación de un medicamento para tratar fibrosis quística, síndrome de enfermedad respiratoria aguda o enfisema.
10
4. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo antagonista específico para un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o un fragmento de la misma que comprende 25, 50, 75, 100 ó 150 aminoácidos contiguos, y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable, para su uso en el tratamiento de fibrosis quística, síndrome de enfermedad respiratoria aguda o enfisema.
15

Figura 1

Mapa de secuencias de ADNc (SEQ ID NO: 1) y aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de polipéptido similar a IL-17 humana

1	CTCAAGTCACTCCCTAAAAGACAGTGGAAATAAATTTGAATAAACAAAACAGGCTTGCT	
61	GAAAAATAAAATCAGGACTCCTAACCTGCTCCAGTCAGCCTGCTTCCACGAGCCCTGTCCAG	
121	TCAGTGCCCCACTTGTGACTGAGTGTGCAGTGCCCCAGCATGTACCAGGTGGTTGCATTCT	
1		M Y Q V V A F L
181	TGGCAATGGTTCATGGGAACCCACACCTACAGCCACTGGCCCCAGCTGTGCCCCAGCAAAG	8
9	A M V M G T H T Y S H W P S C C P S K G	28
241	GGCAGGACACCTCTGAGGAGCTGCTGAGGTGGAGCACTGTGCTGTGCTTCCCTAGAGC	
29	Q D T S E E L L R W S T V P V P L E P	48
301	CTGCTAGGCCCAACCGCCACCCAGAGTCCTGTAGGGCCAGTGAAGATGGACCCCTCAACA	
49	A R P N R H P E S C R A S E D G P L N S	68
361	GCAGGGCCATCTCCCCCTGGAGATATGAGTTGGACAGAGACTTGAACCCGGCTCCCCCAGG	
69	R A I S P W R Y E L D R D L N R L P Q D	88
421	ACCTGTACCACGCCCGTTGCCCTGTGCCCGCCACTGCGTCCAGCCTACAGACAGGCTCCCA	
89	L Y H A R C L C P H C V S L Q T G S H M	108
481	TGGACCCCGGGCAACTCGGAGCTGCTTACCACAACCAGACTGTCTTCTACCGCGGC	
109	D P R G N S E L L Y H N Q T V F Y R R P	128
541	CATGCCATGGCGAAGGGCACCCACAAGGGCTACTGCCCTGGAGCGCAGGCTGTACCGTG	
129	C H G E K G T H K G Y C L E R R L Y R V	148
601	TTTCCTTAGCTTGTGTGTGTGCGGCCCGCTGTGATGGGCTAG	643
149	S L A C V C V R P R V M G *	162

Figura 2A
Mapa de secuencias de ADNc (SEQ ID NO: 3) y aminoácidos (SEQ ID NO: 4)
de polipéptido similar a IL-17 de ratón con péptido señal pronosticado

1	ATGTACCAGGCTGTTGCATTTTGGCAATGATCGTGGGAACCCACACCGTCAGCTTG	19
	M Y Q A V A F L A M I V G T H T V S L	
58	CGGATCCAGGAGGGCTGCAGTCACTTGGCCAGCTGCTGCCCCAGCAAGAGCAAGAACCC	39
111	R I Q E G C S H L P S C C P S K E Q E P	
118	CCGGAGGAGTGGCTGAAGTGGAGCTCTGCATCTGTGTCCCCCAGAGCCTCTGAGCCAC	59
311	P E E W L K W S S A S V S P P E P L S H	
178	ACCCACCACGCAGAACTCTGCAGGGCCAGCAAGGATGGCCCCCTCAACAGCAGGGCCATC	79
511	T H H A E S C R A S K D G P L N S R A I	
238	TCTCCTTGGAGCTATGAGTTGGACAGGACTTGAATCGGGTCCCCCAGGACCTGTACCAC	99
711	S P W S Y E L D R D L N R V P Q D L Y H	
298	GCTCGATGCCCTGTGCCACACTGCGTCCAGCTACAGACAGGCTCCACATGGACCCGCTG	119
911	A R C L C P H C V S L Q T G S H M D P L	
358	GGCAACTCCGTCCACTTTACCACAACCAGACGGTCTTCTACCGGGCCATGCCATGGC	139
1111	G N S V P L Y H N Q T V F Y R R P C H G	
418	GAGGAAGGTACCATCGCCGCTACTGCTTGGAGCGCAGGCTCTACCGAGTCTCCTTGGCT	159
1311	E E G T H R R Y C L E R R L Y R V S L A	
478	TGTGTGTGTGCGGCCCGGTCATGGCTTAGTCATGCTCACCCACCTGCCTGAGGCTGA	170
1601	C V C V R P R V M A *	
538	TGCCCGGTTGGGAGAGGGCCAGGTGTACAATCACCTTGCCAATCGGGCCGGGTTCAA	
598	GCCCTCCAAGCCCTACCTGAAGCAGCAGGCTCCCGGACAAGATGGAGGACTTGGGGAG	
658	AAACTCTGACTTTTGCACTTTTGGGAAGCACTTTTGGGAAGGAGCAGGTTCCCGCTTGTGC	

Figura 2B

718 TGCTAGAGGATGCTGTTGTGGCATTCTACTCAGGAACGGACTCCAAGGCCCTGCTGACC
 778 CTGGAAGCCATACTCCTGGCTCCTTTCCCTGAATCCCCAACTCCTGGCACAGGCACTT
 838 TCTCCACCTCTCCCCCTTTGGCCTTTTGTGTGTTTGTGTCATGCCAACTCTGCCGTGC
 898 AGCCAGGTGTAATTGCCTTGAAGGATGGTTCTGAGGTGAAAAGCTGTATCGAAAAGTGAAG
 958 AGATTTATCCAAATAACATCTGTGTTTAAAAAATAAAAAAATAAAAAAATAAAAAA 1496

Mapa de la forma no secretada de ADNc de polipéptido similar a IL-17 de ratón (SEQ ID NO: 9), y secuencia de aminoácidos correspondiente (SEQ ID NO: 10)

1	CCGGCAGGTGCCCTCGGCGCTCCAAAGCTTAGGGAAGCTCCAGGTGCTTGGGAAAT	
61	GAAGAAAAGGCCACCGAGCAAAAAGGAACAGAGAAGGGAGGAGCAGTGTGGGCTC	
121	GCCTAGGGTCGAGGGCCATTATCACCTACAAATCAGAAATGTTGGAGTGCTATTCTAGAGG	
181	TCTCCATCTTTGCCATTGCTGGTCCCTCAGAAAAGTGTGATGGGGTTGTCCCATTGCCA	
241	AGAACAGCTTCTGCTTACCAGCAGGTGCTGACCTCTTTCCCCAGAGGCACAGGGAAGGAA	
301	TTCCAGCCCCGGTTGGCTGCCAGAGGCTTCCCTCTGGCGTTGGGTACAGGGCAGAGAAAG	
361	AAACCCCAAATGTCCTCCATGAAAACAATGTCCCCGTATCCAGGCCAGATCATTTCTGC	
421	AGTGTCAACAGTTGAGACAAGAAGCTGGGGTCAATTTCTGTGCCCTAAGAGTGCCCTGTTCT	
481	GCACTGGCCCAAGGCTGTTGCATTTCTGGCAATGATCGTGGAAACCCACACCCGTCAGCTTG	
		M I V G T H T V S L
541	CGGATCCAGGAGGGCTGCAGTCACTTGCCCCAGCTGTGCCCCAGCAAAGAGCAAGAACCC	
11	R I Q E G C S H L P S C C P S K E Q E P	10 30

Figura 3A

Apilamiento de la secuencia de aminoácidos de polipéptido similar a IL-17 humana, hIL-17L (SEQ ID NO: 2), con una secuencia de aminoácidos de un miembro de la familia de IL-17 humana conocida, hIL-17 (SEQ ID NO: 5)

Puntuación de Smith-Waterman: 155, 25,0% de identidad en un solapamiento de 160 AA

	10	20	30	40	50	60
hIL-17L	XNQDSXPAPVSL	LLPRGLSVSAPL	VTECAVPSMYQ	VVAFLAMVMG	THTYSHWPSC	CCPSKGGQ
hIL-17			: :::: : :	: : :	: : :	: : :
			MTPGKTSLVSL	LLLLSLEAIVK	GITIPRNP	GCNPSEDK
			10	20	30	
	70	80	90	100	110	120
hIL-17L	DTSEELLRWST	VPVPPLEPAR	PNRHPESCRA	SEDEGFLNS	RAISPWRYEL	DRDLNRLPQDL
hIL-17	: : : : : :	: : : : : :	: : : : : :	: : : : : :	: : : : : :	: : : : : :
	NFPR	TVMVNLNI	-----HNR	TNTNPK	--RSSD	---YYNR
	40	50	60	70	80	

Figura 3B

hIL-17L	130	140	150	160	170	180
	YHARCLCPHCVSLQTGSHMDPLGNSVPLYHNQTVFYRRPCHGEEGTHRRYCLERRLYRVS					
	:: :	:: :	:	: :	: :	: :
hIL-17	90	100	110	120	130	140
	WEAKCRHLGCIN--ADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHCPNS----FRLEKIL--VS					
hIL-17L	190					
	LACVCVRPRVMA					
	: :					
hIL-17						
	VGCTCVTPIVHHVA					
						150

Figura 6A

Apilamiento de la secuencia de aminoácidos de polipéptido similar a IL-17 humana, hIL-17L (SEQ ID NO: 2), con una secuencia de aminoácidos de un miembro de la familia de IL-17 humana conocida, hIL-17c (SEQ ID NO: 8)

PUNTUACIONES Init1: 149 Initn: 194 Opt: 236

Puntuación de Smith-Waterman: 243, 34,5% de identidad en un solapamiento de 171 AA

	20	30	40	50	60	69
hIL-17L	GLSVSAPLVTECAVPSMYQVVAFLAMVMGHTYSHW	-PSCCPSK----	GQDTSELLR--			
		: :	: :	: :	: :	: :
hIL-17c	MTLLPGLLFLTWLHTCLAHHDPSLRGHFPHSHGTPHCYSAEELPLGQAPPHELLARGA					
	10	20	30	40	50	
	70	80	90	100	110	
hIL-17L	-WS-TVPVP---PLEPARP-NRH--PES---C---RASE--DGPLNSRAISPWRVYELDRD					
	: :	: :	: :	: :	: :	: :
hIL-17c	KWQALPVALVSSLEAASHRGRHERPSATQCPVLRPEEVLEADTHQRSISPWRVYRVDTD					
	60	70	80	90	100	110

Figura 6B

hIL-17L	120	130	140	150	160	169
	LNRLPQDLYHARCLCPHCVSLQTGSHMDPLGNSVPLYHNQTVFYRRPCHGEEG---	THR				
hIL-17c	120	130	140	150	160	170
	: : : : : : :					
	EDRYPQKLAFAECLCRGCIDARTGRETAAAL-NSVRLQLQSLVLRRRPC-SRDGSGLPTPG					
hIL-17L	170	180	190			
	RYCLERRLYRVSLACVCRPRVMA					
hIL-17c	180	190				
	: : : : : : :					
	AFAFHTEFIHVPVGCVCVLPKRSV					

Figura 7

Análisis de la expresión mediante transferencia de tipo Northern de fundadores transgénicos sometidos a necropsia TH00-018

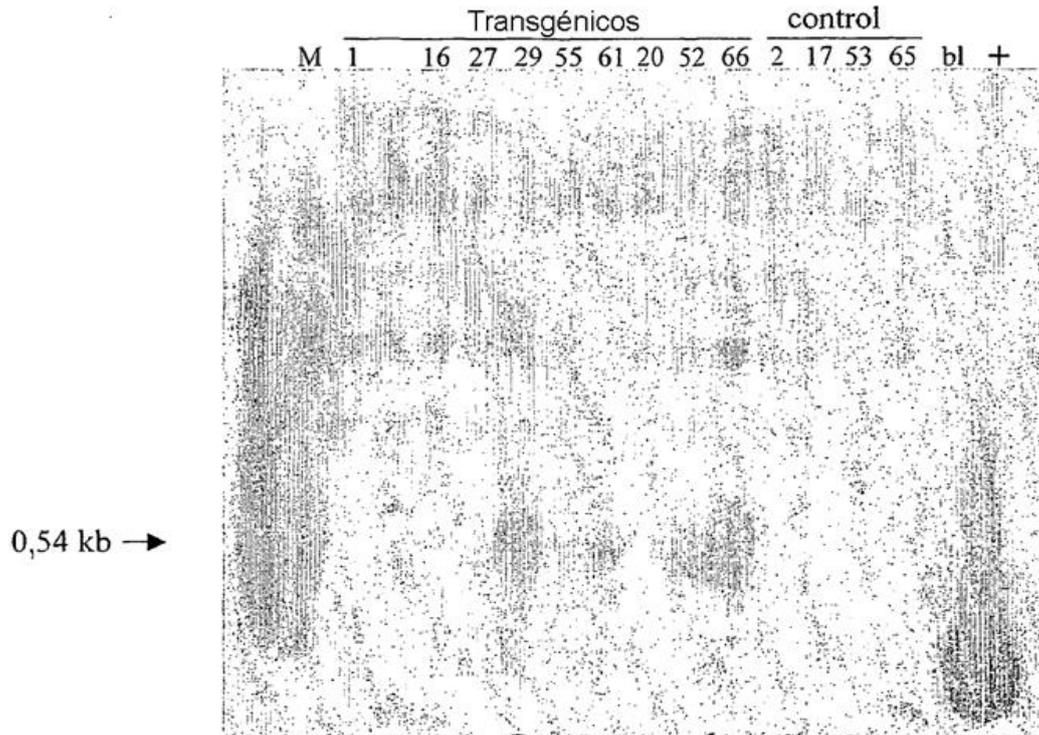


Figura 8

Análisis de la expresión mediante transferencia de tipo Northern de fundadores transgénicos hepatectomizados TH00-018

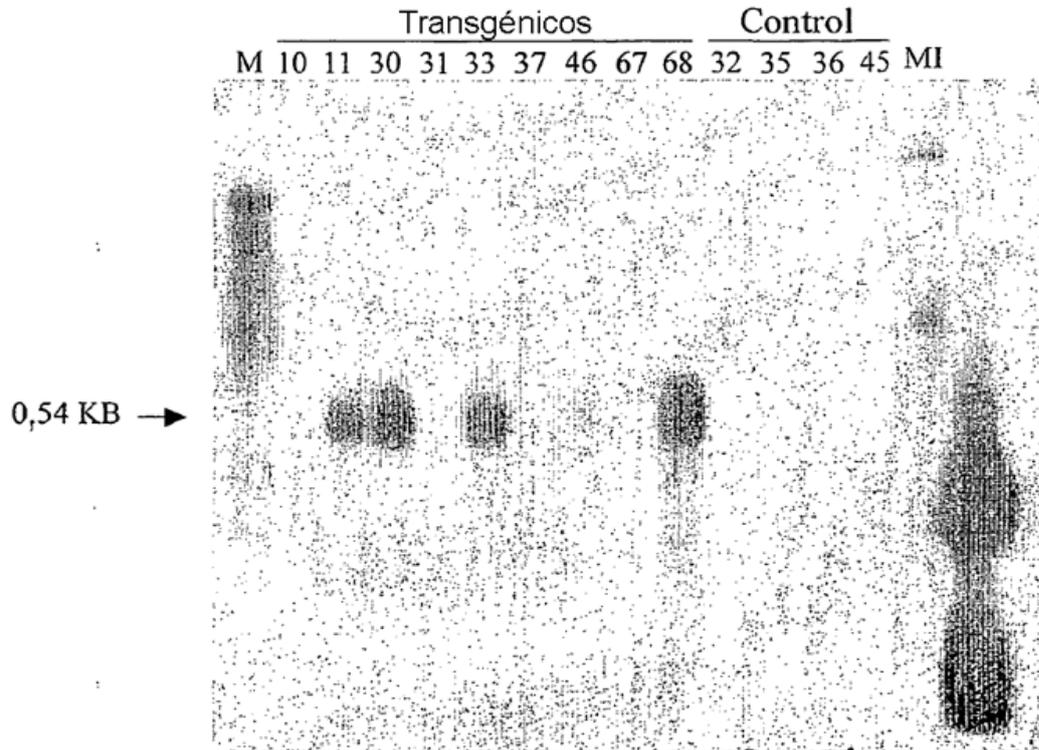


Figura 9

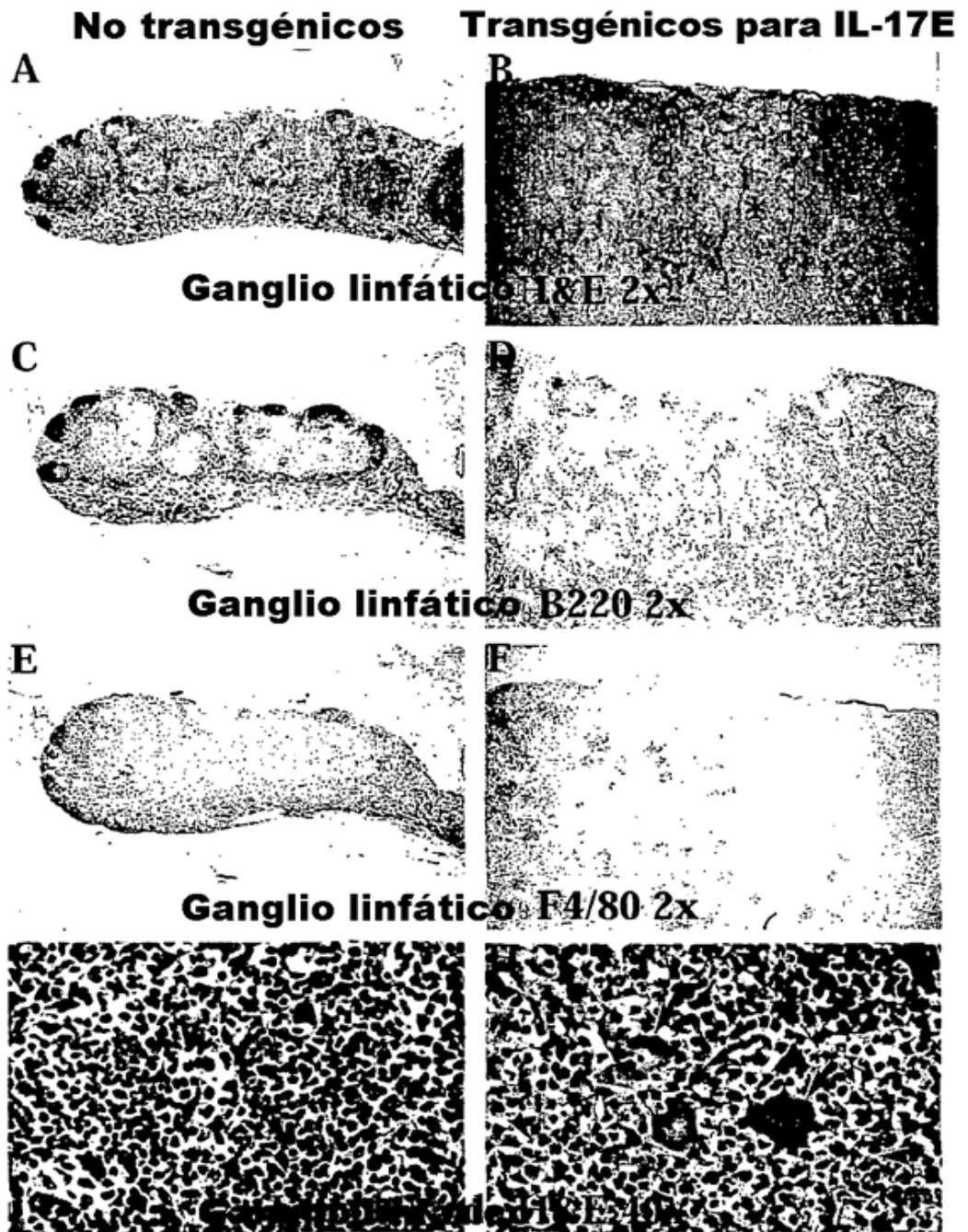


Figura 10

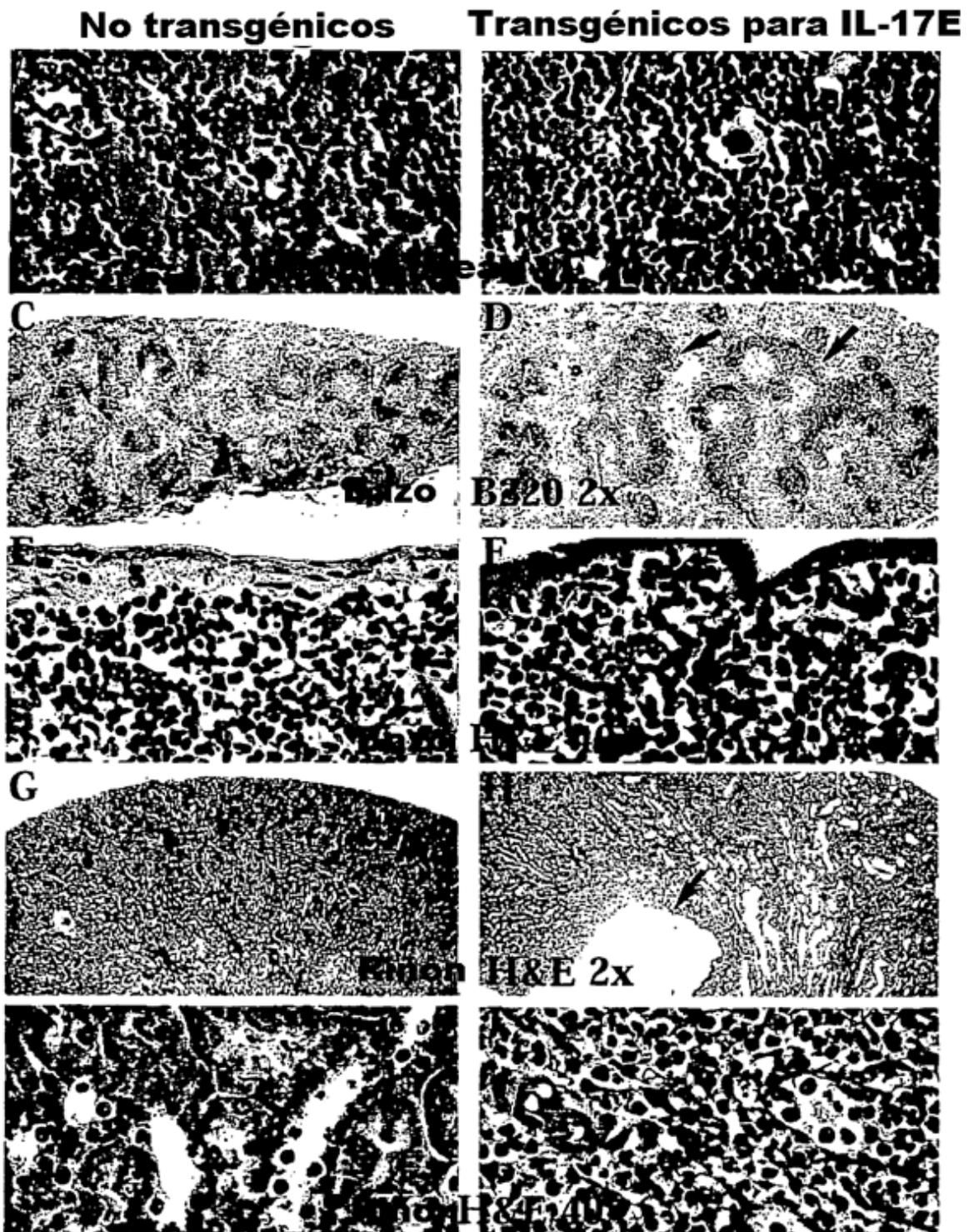


Figura 13

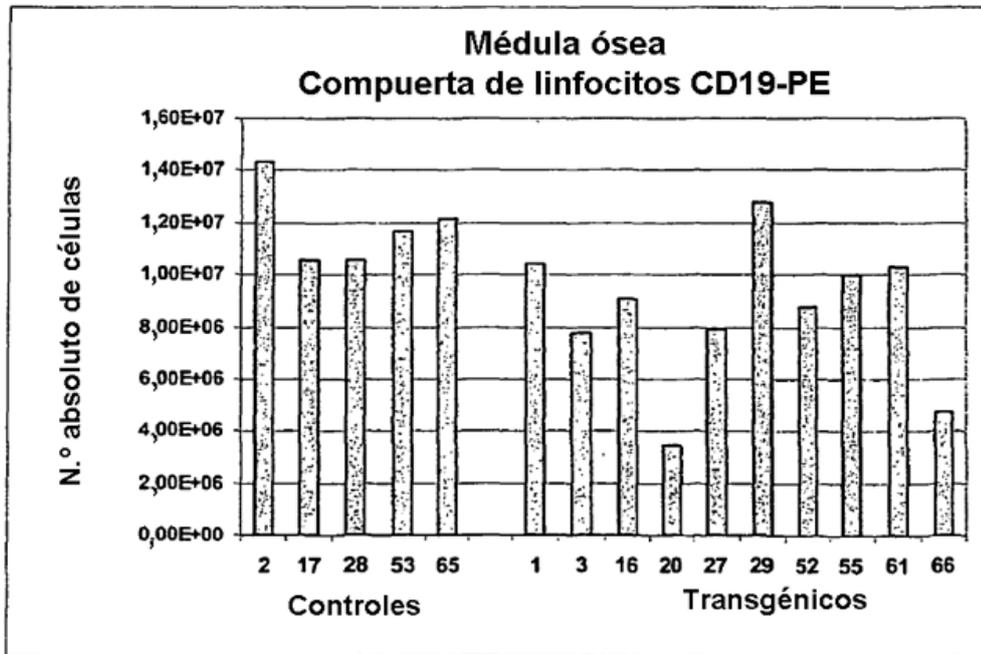


Figura 14

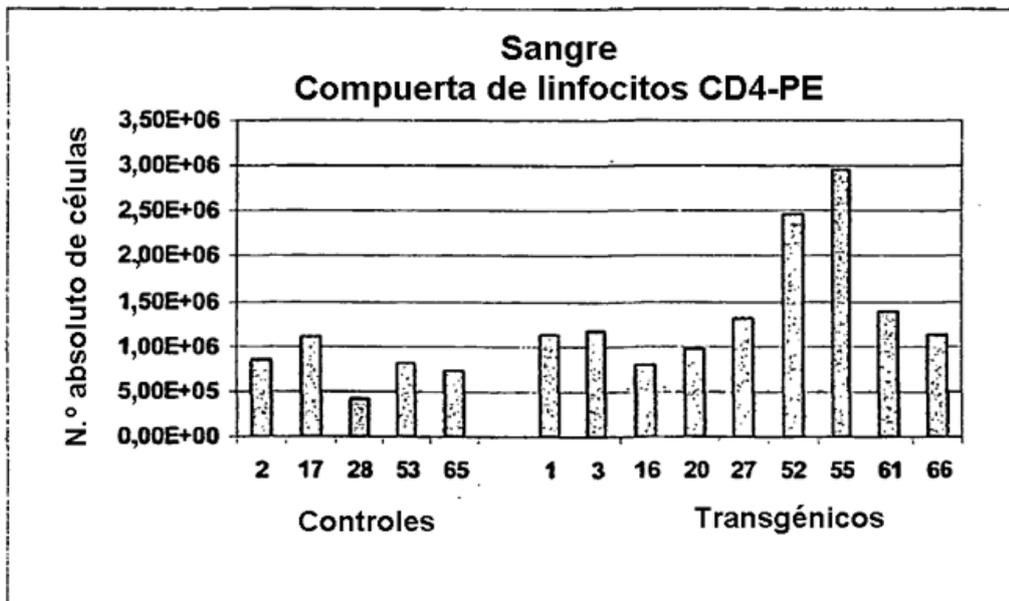


Figura 15

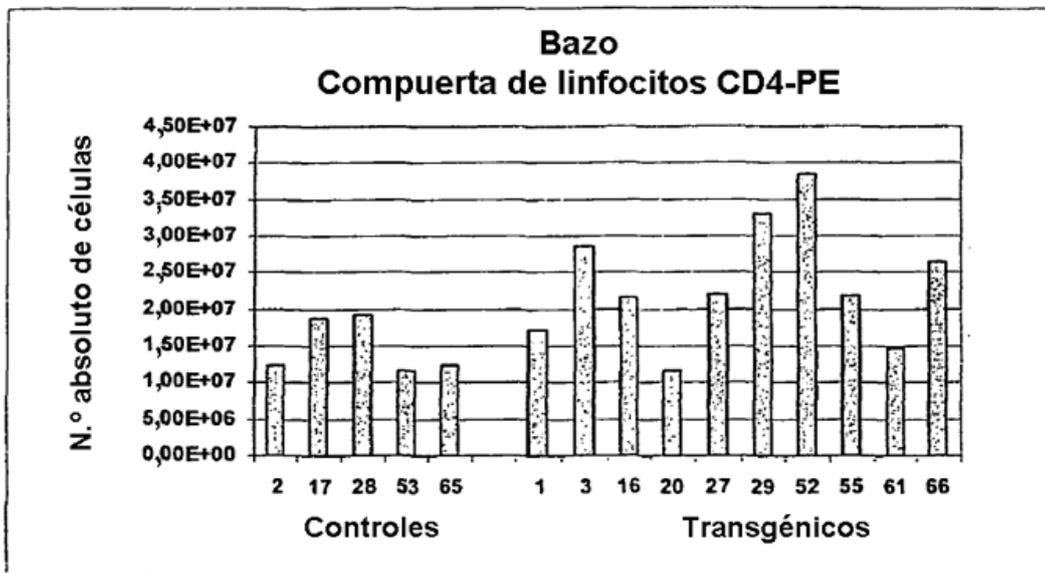


Figura 16

**CÉLULAS CD45R+ QUE EXPRESAN IL17Br
EN MÉDULA ÓSEA TRANSGÉNICA**

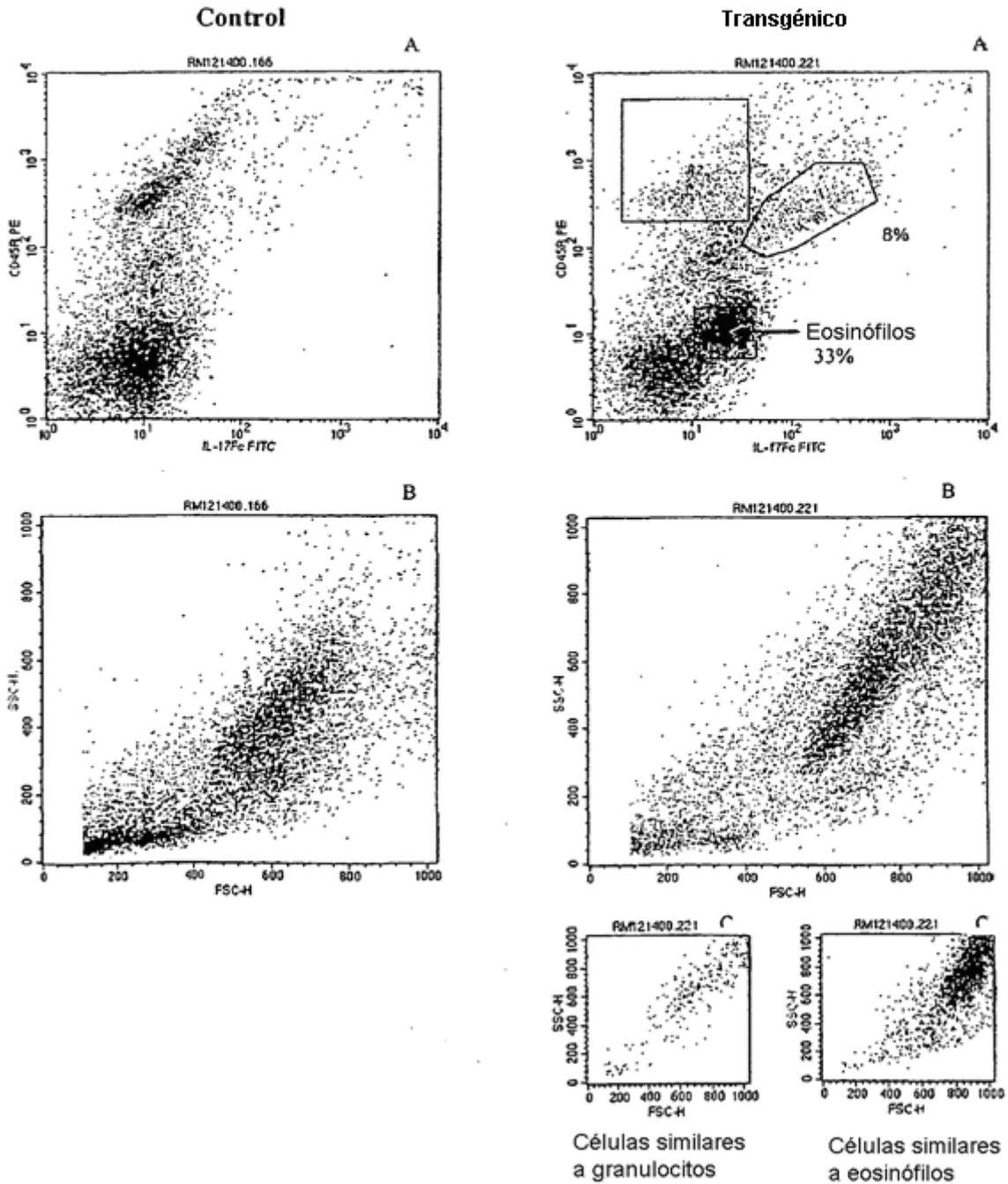


Figura 17

**CÉLULAS CD4+ QUE EXPRESAN
IL17Br EN MÉDULA ÓSEA
TRANSGÉNICA**

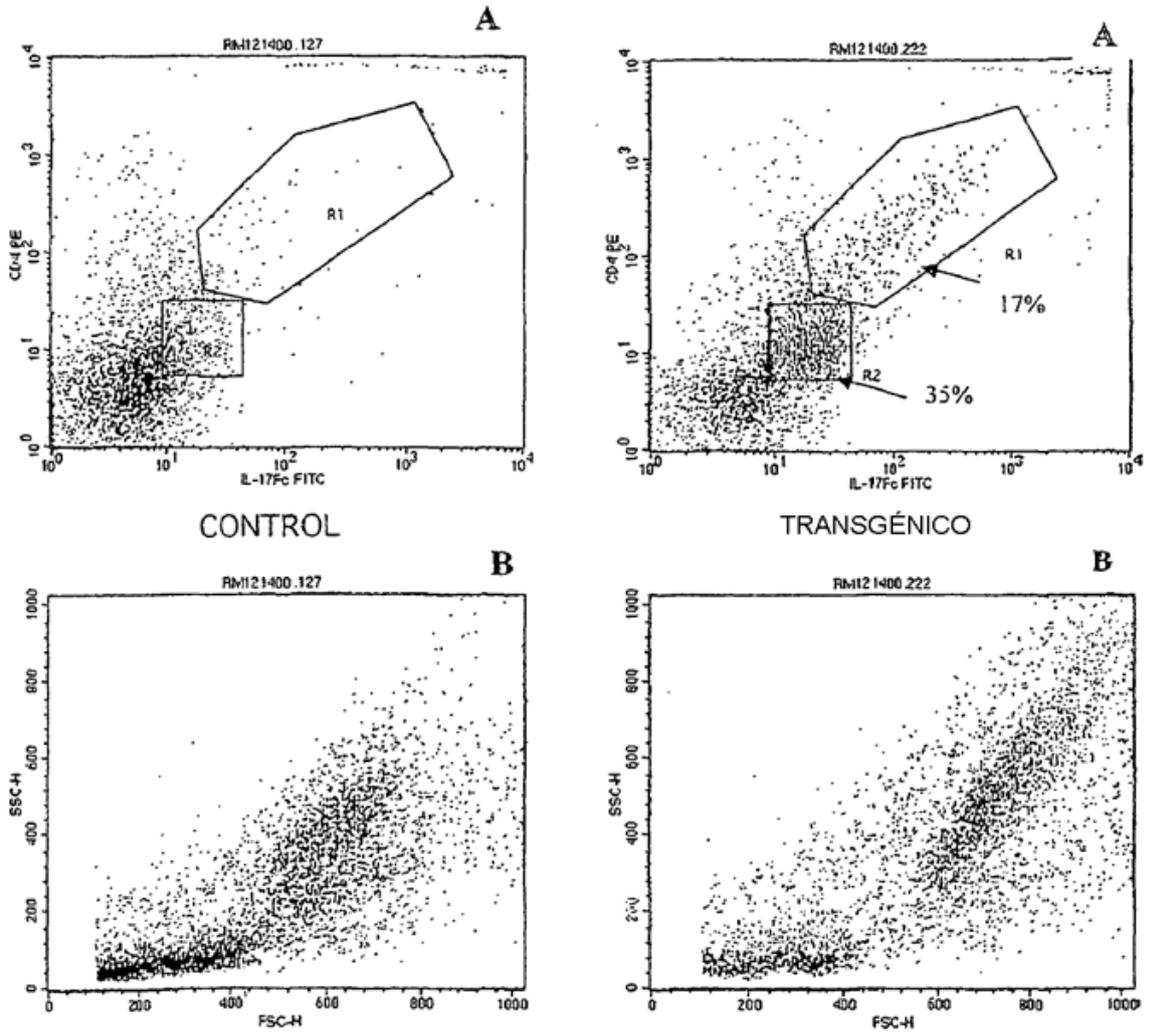


Figura 18

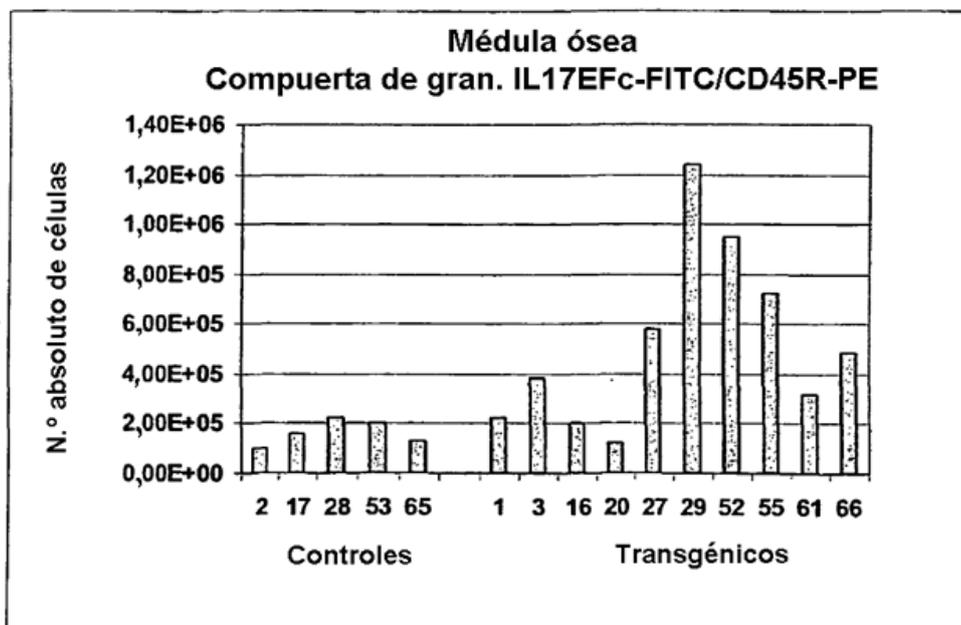


Figura 19

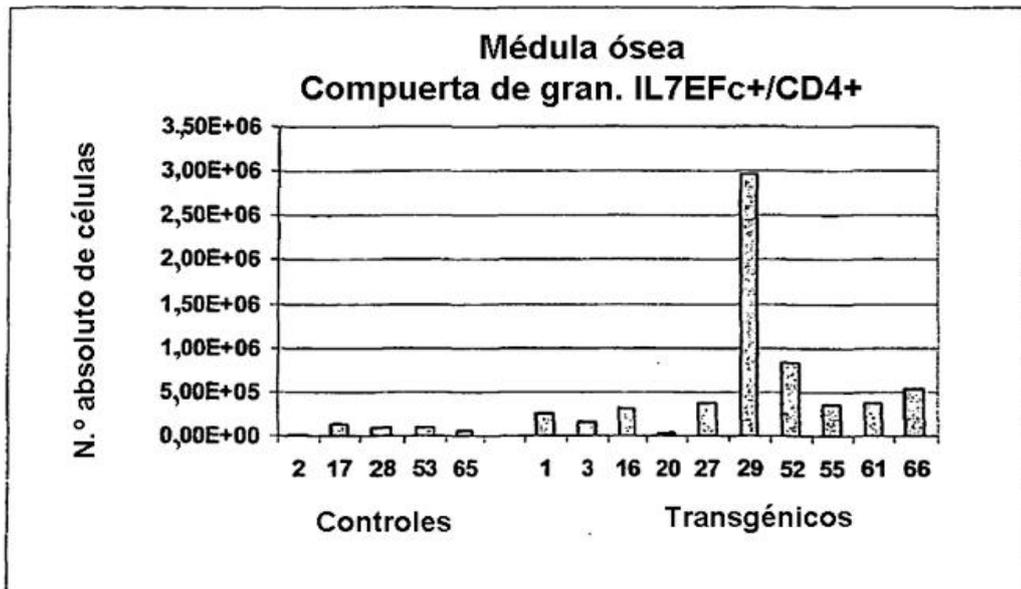


Figura 20

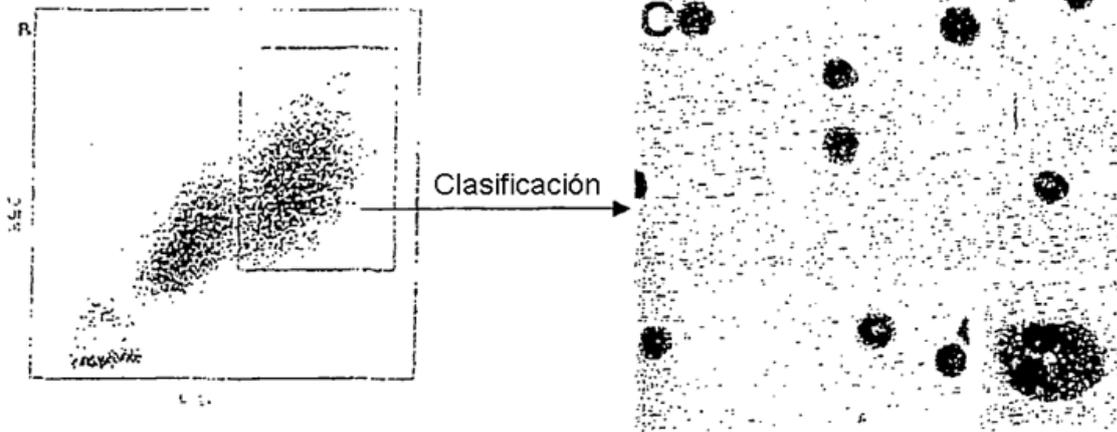


Figura 21A

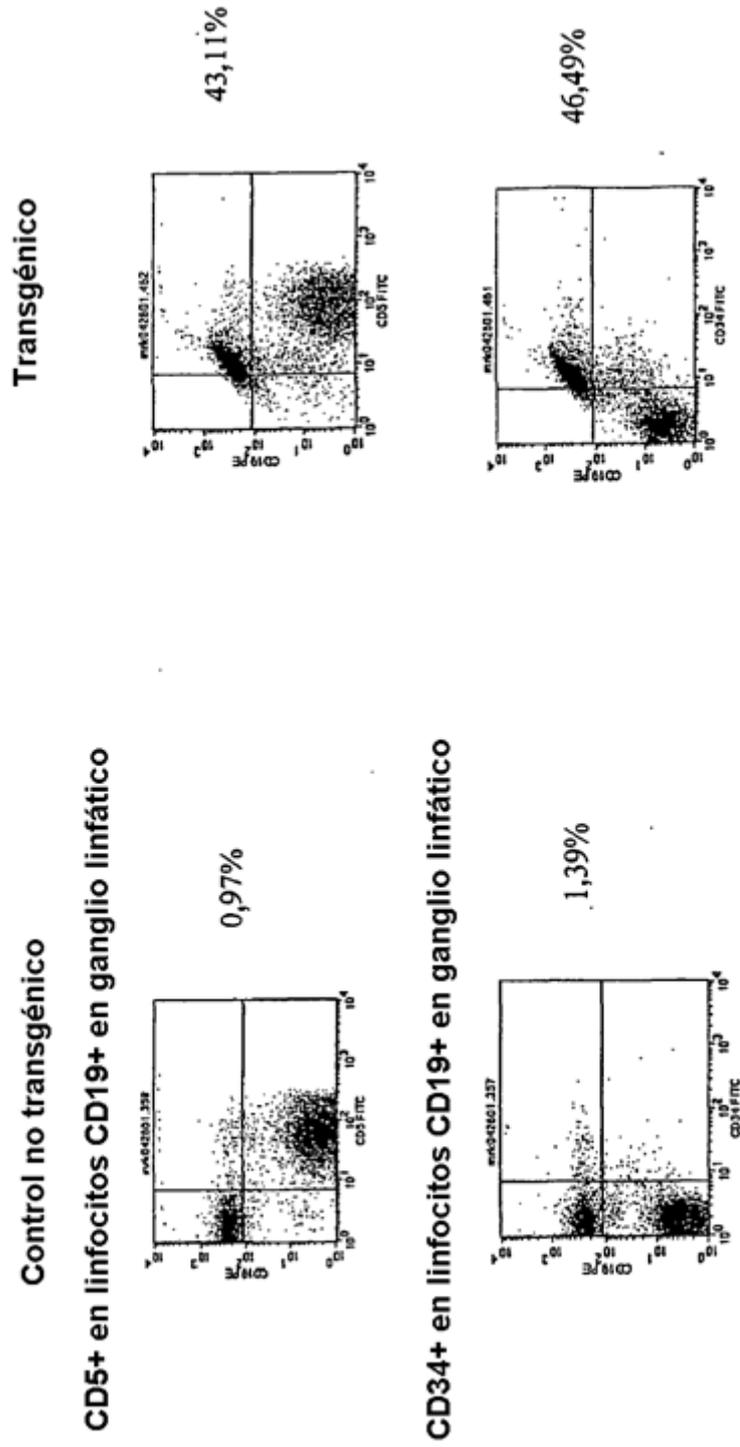


Figura 21B

Expresión de CD4 en eosinófilos en médula ósea

