

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 835**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/24** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**C07K 14/54** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2006** **E 06850198 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013** **EP 1963369**

54 Título: **Antagonistas de IL-21**

30 Prioridad:

**28.11.2005 US 740154 P**

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

**28.06.2013**

73 Titular/es:

**ZYMOGENETICS, INC. (100.0%)**  
**1201 Eastlake Avenue East**  
**Seattle, WA 98102, US**

72 Inventor/es:

**SIVAKUMAR, PALLAVUR V. y**  
**JASPERS, STEPHEN R.**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 409 835 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

Antagonistas de IL-21.

- 5 **[0001]** El sistema inmunitario es la defensa principal del cuerpo contra enfermedades causadas por patógenos, especialmente bacterias, virus, hongos, etc., así como contra enfermedades causadas por crecimiento anormal de las células y tejidos propios del cuerpo (es decir, tumores cancerosos). Normalmente, el sistema inmunitario es capaz de distinguir entre las células normales del cuerpo o "propias" y patógenos externos o células anormales o "no propias". Los procedimientos por los cuales el sistema inmunitario se abstiene de reaccionar a un cuerpo propio se denomina tolerancia. Algunas veces, el sistema inmunitario pierde la capacidad para reconocer la "propia" como normal y la respuesta posterior dirigida contra el tejido o células, resulta en la pérdida de tolerancia, un estado de autoinmunidad. Las patologías que resultan de la autoinmunidad a menudo tienen consecuencias clínicas serias y son uno de los mayores problemas de salud en el mundo, especialmente en países desarrollados.
- 10
- 15 **[0002]** Las citocinas generalmente estimulan la proliferación o diferenciación de células del linaje hematopoyético o participan en los mecanismos de respuesta inmunes e inflamatorios del cuerpo. Las interleucinas son una familia de citocinas que median respuestas inmunes. Los receptores que unen citocinas se componen típicamente de una o más proteínas de membranas integrales que unen la citocina con alta afinidad y transducen este acontecimiento de unión a la célula a través de las porciones citoplasmáticas de ciertas subunidades de receptores. Los receptores de citocinas se han agrupado en varias clases en base a las similitudes en sus dominios de unión a ligando extracelular. Por ejemplo, las cadenas de receptor responsables de la unión y/o la transducción del efecto de los interferones son miembros de la familia del receptor de citocina de la clase II, en base a un dominio extracelular de 200 residuos característico.
- 20
- 25 **[0003]** La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-IL-21 y sus usos en el tratamiento de una enfermedad autoinmune, como se define en las reivindicaciones.
- [0004]** El documento WO 99/61617 describe IL-21 e IL-22.
- 30 **[0005]** El documento WO 03/040313 describe antagonistas de IL-21.
- [0006]** El documento WO 2004/083249 describe anticuerpos contra un receptor de IL-21 humano, y usos para el mismo.
- 35 **[0007]** Ueda Maki y col., British Journal of Haematology, enero de 2005, Vol. 128(2), páginas 169-176, describen la expresión del receptor de IL-21 funcional sobre células de leucemia de linfocitos T adultos.
- [0008]** La presente memoria descriptiva describe un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 que se une a una región de antígeno de IL-21 humano. Un anticuerpo monoclonal puede unirse a una región antigénica de IL-21 que se muestra en la SEQ ID NO: 6 a partir de los residuos aminoacídicos 97-122. Un anticuerpo monoclonal puede unir una región antigénica como se muestra en la SEQ ID NO: 6 a partir de los residuos aminoacídicos 145 a 148. Un anticuerpo monoclonal puede unir una región antigénica como se muestra en la SEQ ID NO: 6 a partir de los residuos aminoacídicos 154 a 162. Un anticuerpo monoclonal puede unir una región de antígeno como se muestra en la SEQ ID NO: 6 a partir de los residuos aminoacídicos 30 a 50. La memoria descriptiva describe un anticuerpo monoclonal que se une a una región de antígeno como se muestra en la SEQ ID NO: 6 a partir de los residuos aminoacídicos 40 a 50. Los anticuerpos monoclonales de la invención que se describen en este documento pueden mostrarse para neutralizar una actividad de proteína humana IL-21. Los anticuerpos monoclonales descritos en este documento pueden mostrarse para unir una proteína IL-21-Fc humana, unir una proteína Fc de muteína humana, donde las mutaciones están en Gln 145 y/o Ile148 de la SEQ ID NO: 6, o unir una proteína de fusión Fc de ratón IL-21-ratón. Generalmente, los anticuerpos monoclonales descritos en este documento unen dos o más proteínas IL-21.
- 40
- 45
- 50 **[0009]** En otros aspectos de la invención, el anticuerpo monoclonal (como se define en las reivindicaciones) se une específicamente al epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal 272.21.1.13.4.2 (ATCC con N° de Acceso PTA-10395). La memoria descriptiva también describe un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal 268.5.1.11.42.1.4.3.9 (ATCC con N° de Acceso PTA-10394). Los anticuerpos monoclonales de la presente invención también pueden etiquetarse con un marcador detectable y el marcador detectable puede seleccionarse a partir de, pero sin limitación, isótopo radiactivos, enzimas, colorante y biotinas.
- 60
- [0010]** La presente invención describe una preclasificación (o grupo de anticuerpos) que es capaz de competir con un anticuerpo monoclonal 272.21.1.13.4.2 (ATCC con N° de Acceso PTA-10395) para unir un antígeno IL-21 humano.
- 65 **[0011]** La memoria descriptiva describe una preclasificación que es capaz de competir con un anticuerpo monoclonal 268.5.1.11.42.1.4.3.9 (ATCC con N° de Acceso PTA-10394) para la unión de un antígeno IL-21 humano.

**[0012]** También se incluyen en la presente invención hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales reivindicados, como se define en las reivindicaciones.

**[0013]** La presente invención proporciona un procedimiento de producción de los anticuerpos monoclonales reivindicados, que comprenden: (a) proporcionar un hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal; y (b) cultivar el hibridoma en condiciones que proporcionen la producción del anticuerpo monoclonal por el hibridoma, como se define en las reivindicaciones.

**[0014]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune. En ciertas realizaciones, la enfermedad autoinmune se selecciona entre el grupo que consiste en pancreatitis, diabetes de tipo I (IDDM), enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diverticulosis, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, espondilitis anquilosante, escleroderma, esclerosis sistémica, artritis psoriásica, osteoartritis, dermatitis atópica, vitiligo, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), linfoma cutáneo de linfocitos T (LCLT), síndrome de Sjogren, glomerulonefritis, nefropatía por IgA, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo al trasplante, dermatitis atópica, síndrome antifosfolípido, asma, y otras enfermedades autoinmunes.

**[0015]** La presente memoria descriptiva describe un procedimiento para inhibir o reducir un trastorno mediado por IL-21 que comprende administrar un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 en una cantidad suficiente para inhibir o reducir la actividad biológica mediada por IL-21 en el sujeto.

**[0016]** Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar el entendimiento de las invenciones descritas en este documento.

**[0017]** Las expresiones "anticuerpo" o "péptidos de anticuerpo" se refieren a un anticuerpo intacto, o un fragmento de unión del mismo que compite con el anticuerpo intacto para una unión específica, e incluye anticuerpos quiméricos, humanizados, completamente humanos y biespecíficos. Los fragmentos de unión pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante. Los fragmentos de unión pueden producirse mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab' , F(ab')<sub>2</sub>, Fv y anticuerpos de cadena sencilla.

**[0018]** La expresión "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interfieren con los usos de diagnóstico o terapéuticos para del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos y no proteínicos. El anticuerpo puede purificarse (1) a más del 95% en peso del anticuerpo, como se determina por el método Lowry, y más preferiblemente más del 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 restos del terminal N o la secuencia aminoacídica interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) para la homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reducidas o no reducidas usando azul Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del ambiente natural de los anticuerpos no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

**[0019]** Un anticuerpo de "variante" anti-IL-21 se refiere en este documento a una molécula que difiere en la secuencia aminoacídica de una secuencia aminoacídica del anticuerpo anti-IL-21 "precursor" en virtud de la adición, eliminación y/o sustitución de uno o más restos aminoacídicos en la secuencia del anticuerpo precursor. La variante puede comprender al menos una, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez, y preferiblemente de aproximadamente dos a aproximadamente cinco substituciones en una o más regiones hipervariables del anticuerpo precursor. Ordinariamente, la variante tendrá una secuencia aminoacídica que tiene al menos una identidad de secuencia aminoacídica al 75% con las secuencias de dominio variables de cadena ligera o pesada del anticuerpo precursor, más preferiblemente al menos al 80%, más preferiblemente al menos al 85%, más preferiblemente al menos al 90%, y más preferiblemente al menos al 95%. La identidad u homología con respecto a esta secuencia se define en este documento como el porcentaje de restos aminoacídicos en la secuencia candidata que son idénticos a los restos del anticuerpo precursor, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, eliminaciones, o inserciones N-terminal, C-terminal o internas en la secuencia del anticuerpo deberán construirse de forma que afecten la identidad u homología de la secuencia. La variante mantiene la capacidad para unir IL-21 humano y preferiblemente tiene propiedades que son superiores a las del anticuerpo precursor. Por ejemplo, la variante puede tener una afinidad de unión más fuerte, una mejor capacidad para inhibir la estimulación inducida por IL-21 de células inmunes. Para analizar dichas propiedades, deberá compararse una forma Fab de la variante con una forma Fab del anticuerpo precursor, o una forma de longitud completa de la variante con una forma de longitud completa del anticuerpo precursor, por ejemplo, ya que se ha descubierto que el formato del anticuerpo anti-IL-21 impacta su actividad en los ensayos de actividad biológica desvelados en este documento. El anticuerpo variante de interés particular en este documento es uno que muestra al menos aproximadamente 10 veces, preferiblemente al menos aproximadamente 20 veces, y más preferiblemente al menos aproximadamente 50 veces, un aumento en la actividad biológica en comparación con el anticuerpo precursor.

**[0020]** La expresión "anticuerpo precursor", como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo que se codifica por una secuencia aminoacídica usada para la preparación de la variante. Preferiblemente, el anticuerpo precursor tiene una región de estructura humana y, si se presenta, tiene regiones constantes de anticuerpo humano. Por ejemplo, el anticuerpo precursor puede ser un anticuerpo humanizado o humano.

**[0021]** El término "agonista" se refiere a cualquier compuesto que incluye una proteína, polipéptido, péptido, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, molécula grande o molécula pequeña (menos de 10 kD), que aumenta la actividad, activación o función de otra molécula. Los agonistas IL-21 provocan, por ejemplo: la estimulación de células NK, subconjuntos de linfocitos T y subconjuntos de linfocitos B y células dendríticas.

**[0022]** El término "antagonista" se refiere a cualquier compuesto que incluye una proteína, polipéptido, péptido, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, molécula grande o molécula pequeña (menos de 10 kD), que disminuye la actividad, activación o función de otra molécula. Los antagonistas de IL-21 causan: un descenso de la función inmune de las células NK, subconjuntos de linfocitos T y subconjuntos de linfocitos B y células dendríticas; la unión de IL-21 de tal manera que la interacción de la proteína IL-21 se bloquea, inhibe, reduce, antagoniza o neutraliza.

**[0023]** Un "anticuerpo bivalente" diferente a un anticuerpo "multiespecífico" o "multifuncional", en ciertas realizaciones, se entiende que comprende sitios de unión que tienen especificidad antigénica idéntica.

**[0024]** Un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido que tiene dos pares de cadena ligera/pesada diferentes y dos sitios de unión diferentes. Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse por una diversidad de procedimientos incluyendo, pero sin limitación, fusión de hibridomas o enlace de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990); Kostelny y col., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992).

**[0025]** La expresión "anticuerpo quimérico" o "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpo cuyos genes de cadena ligera o pesada se han construido, típicamente por ingeniería genética, a partir de genes de región constante y variable de inmunoglobulina pertenecientes a especies diferentes. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos, tales como gamma 1 y gamma 3. Por lo tanto, un anticuerpo quimérico terapéutico típico es una proteína híbrida compuesta por la variable o dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio constante de un anticuerpo humano, aunque pueden usarse otras especies de mamíferos.

**[0026]** La expresión "valoración neutralizante eficaz", como se usa en este documento, se refiere a la cantidad de anticuerpo que corresponde a la cantidad presente en el suero de animales (ser humano o rata alodónera) que ha demostrado ser clínicamente eficaz (en seres humano) o que reduce el virus al 99% en, por ejemplo, las ratas alodóneras. La reducción del 99% se define por una exposición específica de, por ejemplo,  $10^3$  pfu,  $10^4$  pfu,  $10^5$  pfu,  $10^6$  pfu,  $10^7$  pfu,  $10^8$  pfu o  $10^9$  pfu) de VSR.

**[0027]** El término "epítipo" incluye cualquier determinante de proteína capaz de la unión específica a una inmunoglobulina o receptor de linfocito T. Las determinantes epitópicas normalmente consisten en agrupaciones de superficie químicamente activa de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Más específicamente, el término "epítipo IL-21", como se usa en este documento, se refiere a una porción de un polipéptido IL-21 que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferiblemente en un mamífero, y más preferiblemente en un ratón o un ser humano. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es una porción de un polipéptido IL-21 que produce una respuesta de anticuerpo en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es una porción de un polipéptido IL-21 al cual un anticuerpo se une inmuno-específicamente como se determina por cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, por ejemplo, por inmunoensayos. Los epítipos antigénicos no necesitan necesariamente ser inmunogénicos.

**[0028]** El término "epítipo etiquetado", cuando se usa en este documento, se refiere al anticuerpo anti-IL-21 condensado a una "etiqueta de epítipo". El polipéptido de etiqueta de epítipo tiene restos suficientes para proporcionar un epítipo contra el cual se puede hacer un anticuerpo, aún es suficientemente corto de tal manera que no interfiere con la actividad del anticuerpo IL-21. La etiqueta de epítipo preferiblemente es suficientemente única de manera que el anticuerpo no esté substancialmente en una reacción cruzada con otros epítipos. Los polipéptidos de etiqueta adecuados generalmente tienen al menos 6 restos aminoacídicos y normalmente entre aproximadamente de 8-50 restos aminoacídicos (preferiblemente entre aproximadamente 9-30 restos). Los ejemplos incluyen el polipéptido de etiqueta HA flu y su anticuerpo 12CA5 (Field y col. Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165 (1988)); la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para la misma (Evan y col., Mol. Cell. Biol. 5(12): 3610-3616 (1985)); y la etiqueta de glicoproteína D del virus de Herpes Simple (gD) y su anticuerpo (Paborsky y col., Protein Engineering 3(6): 547-553 (1990)). En ciertas realizaciones, la etiqueta de epítipo es un "epítipo de unión al receptor de salvamento". Como se usa en este documento, el término "epítipo de unión al receptor de salvamento" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> o IgG<sub>4</sub>) que es

responsable del aumento de la semivida en suero *in vivo* de la molécula IgG.

**[0029]** El término "fragmento", como se usa en este documento, se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica de al menos 5 restos aminoacídicos contiguos, al menos 10 restos aminoacídicos contiguos, al menos 15 restos aminoacídicos contiguos, al menos 20 restos aminoacídicos contiguos, al menos 25 restos aminoacídicos contiguos, al menos 40 restos aminoacídicos contiguos, al menos 50 restos aminoacídicos contiguos, al menos 60 restos aminoacídicos contiguos, al menos 70 restos aminoacídicos contiguos, al menos 80 restos aminoacídicos contiguos, al menos 90 restos aminoacídicos contiguos, al menos 100 restos aminoacídicos contiguos, al menos 125 restos aminoacídicos contiguos, al menos 150 restos aminoacídicos contiguos de la secuencia aminoacídica de un polipéptido IL-21 o un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido IL-21.

**[0030]** Como se usa en este documento, el término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos substancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Una forma de inmunoglobulina constituye la unidad estructural básica de un anticuerpo. Esta forma es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de cadenas de inmunoglobulina, teniendo cada par una cadena pesada y una ligera. En cada par, las regiones variables de cadena pesada y ligera son responsables en conjunto de unirse a un antígeno, y las regiones constantes son responsables de las funciones efectoras del anticuerpo.

**[0031]** Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos) se codifican por un gen de región variable en el término NH<sub>2</sub> (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de región constante kappa o lambda en el término COOH. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos), se codifican similarmente por un gen de región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de región constante que se han mencionado anteriormente (aproximadamente 330 aminoácidos). Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o epsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas pesadas y ligeras, las regiones variables y constantes se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. (Véase, generalmente, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 2<sup>a</sup> ed. Raven Press, N. Y., 1989), Cap. 7.

**[0032]** Una región variable de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina consiste en una región de "estructura" interrumpida por tres regiones hipervariables. Así, la expresión "región hipervariable" se refiere a los residuos aminoacídicos de un anticuerpo los cuales son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende restos aminoacídicos de una "Región Determinante Complementaria" o "CDR" (es decir, restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada (véase, Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5<sup>a</sup> Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o los restos de un "bucle hipervariable" (es decir, restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917, 1987). La "región estructural" o restos "FR" son los residuos de dominio variable diferentes a los residuos de región hipervariable como se definen en este documento. Las secuencias de las regiones estructurales de cadenas pesada o ligera diferentes se conservan relativamente dentro de una especie. Así, una "región de estructura humana" es una región de estructura que es substancialmente idéntica (aproximadamente el 85% o más, normalmente el 90-95% o más) a la región estructural de una inmunoglobulina humana de origen natural. La región estructural de un anticuerpo, que es las regiones estructurales combinadas de las cadenas de cadenas pesadas o ligeras de los constituyentes, sirven para posicionar y alinear las CDR. Las CDR son responsables principalmente de unir a un epítipo de un antígeno.

**[0033]** Por consiguiente, el término inmunoglobulina "humanizada" se refiere a una inmunoglobulina que comprende una región de estructura humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (normalmente un ratón o rata). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDR se llama el "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona la estructura se llama el "aceptor". Las regiones constantes no se necesitan estar presentes, pero si lo están, deben ser substancialmente idénticas a regiones constantes de inmunoglobulina humana, es decir, idénticas al menos aproximadamente al 85-90%, preferiblemente aproximadamente al 95% o más. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son substancialmente idénticas a las partes correspondientes de secuencias de inmunoglobulina humana naturales. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina de cadena ligera humanizada y una de cadena pesada humanizada. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado podría no incluir un anticuerpo quimérico típico como se ha definido anteriormente, por ejemplo, debido a que la región variable entera de un anticuerpo quimérico no es humana.

**[0034]** Como se usa en este documento, la expresión "anticuerpo humano" incluye un anticuerpo que tiene una secuencia aminoacídica de una inmunoglobulina humana e incluye anticuerpos aislados de colecciones de inmunoglobulina humana o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulina humana y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como se describe, por ejemplo, por Kucherlapati y col. en la patente de Estados

Unidos N° 5.939.598.

**[0035]** La expresión "anticuerpos genéticamente alterados" se refiere a anticuerpos en los que la secuencia aminoacídica se ha variado de la un anticuerpo nativo. Debido a la importancia de las técnicas de ADN recombinante en la generación de anticuerpos, no es necesario limitarse a las secuencias aminoacídicas que se encuentran en los anticuerpos naturales; los anticuerpos pueden ser rediseñados para obtener las características deseadas. Las variaciones posibles son muchas y está en el rango del cambio de solo uno o algunos aminoácidos al rediseño completo de, por ejemplo, la región variable o constante. Los cambios en la región constante, en general, se harán con objeto de mejorar o alterar características, tales como la fijación del complemento, interacción con membranas y otras funciones efectoras. Los cambios en la región variable se harán con objeto de mejorar las características de unión al antígeno.

**[0036]** Además de los anticuerpos, las inmunoglobulinas pueden existir en una diversidad de formas diferentes incluyendo, por ejemplo, cadena sencilla o Fv, Fab, y (Fab')<sub>2</sub>, así como diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos multivalentes o multiespecíficos híbridos (como se ha descrito anteriormente y en detalle en: Lanzavecchia y col., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)) y en cadenas simples (por ejemplo, Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85: 5879-5883 (1988) y Bird y col., Science. 242: 423-426 (1988)). (Véase, generalmente, Hood y col., "Immunology", Benjamin, N.Y., 2ª ed. (1984), y Hunkapiller y Hood, Nature. 323: 15-16 (1986)).

**[0037]** Como se usa en este documento, las expresiones "Fv de cadena sencilla", "anticuerpos de cadena sencilla", "Fv" o "scFv" se refieren a fragmentos de anticuerpo que comprenden las regiones variables de tanto las cadenas ligeras como las pesadas, pero carecen de las regiones constantes, pero dentro de una cadena de polipéptido sencilla. Generalmente, un anticuerpo de cadena sencilla comprende adicionalmente un enlace polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite formar la estructura deseada que podría permitir la unión al antígeno. Los anticuerpos de cadena sencilla se analizan en detalle por Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994); véase también la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° WO 88/01649 y las patentes de Estados Unidos N° 4.946.778 y 5.260.203. Los anticuerpos de cadena sencilla también pueden ser bi-específicos y/o humanizados.

**[0038]** Un "fragmento Fab" está comprendido de una cadena ligera y el C<sub>H1</sub> y regiones variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace de disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

**[0039]** Un "fragmento Fab" contiene una cadena ligera y una cadena pesada que contiene la mayoría de la región constante, entre los dominios C<sub>H1</sub> y C<sub>H2</sub>, de tal manera que puede formarse un enlace de disulfuro intercadena entre dos cadenas pesadas para formar una molécula F(ab')<sub>2</sub>.

**[0040]** Un "fragmento F(ab')<sub>2</sub>" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios C<sub>H1</sub> y C<sub>H2</sub>, de tal manera que se forma un enlace de disulfuro de intercadena entre dos cadenas pesadas.

**[0041]** El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) en la misma cadena polipeptídica (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>). Al usar un enlazador que es demasiado corto para permitir pares entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a formar pares con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).

**[0042]** El término "anticuerpo lineal" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata y col. Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

**[0043]** La expresión "fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional", como se usa en este documento, se refiere a un fragmento polipeptídico que contiene al menos los dominios variables de las cadenas de inmunoglobulina pesadas y ligeras. Un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional es capaz de unirse a un ligando, prevenir la unión del ligando a su receptor, interrumpir la respuesta biológica resultante de la unión del ligando al receptor, o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional se une específicamente a IL-21.

**[0044]** La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en este documento, no se limita a los anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridomas. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se obtiene a partir de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariótico, procariótico o fago, y no el procedimiento por el que se produce.

5 [0045] La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales, como se define en las reivindicaciones, que se unen específicamente con proteínas y polipéptidos IL-21. Los polipéptidos, proteínas y polinucleótidos IL-21 humanos y de ratón que codifican los polipéptidos se desvelan en Parrish-Novak y col., Nature 408: 57-63, 2003, las patentes de Estados Unidos N° 6.307.024 y 6.686.178 y el documento WO 04/055168. Los anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos neutralizantes, y pueden ser anticuerpos monoclonales de murino, anticuerpos humanizados obtenidos a partir de anticuerpos monoclonales de murino y anticuerpos monoclonales humanos. Los fragmentos de anticuerpo ilustrativos incluyen F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv, scFv y unidades de reconocimiento mínimas. Los anticuerpos neutralizantes se unen preferiblemente a IL-21 de tal modo que se bloquee, inhiba, antagonice o neutralice la interacción de IL-21. Se describen en este documento epítomos y características estructurales y funcionales que definen regiones de la proteína humana IL-21 que se han identificado como dianas para un anticuerpo monoclonal terapéutico. Se presentan anticuerpos monoclonales IL-21 de ratón dirigidos contra humano ejemplares y los anticuerpos monoclonales de rata dirigidos contra humano y agrupaciones de estos anticuerpos monoclonales con la capacidad de unirse a IL-21 humano de tipo natural, una proteína IL-21 mutante y/o regiones peptídicas de IL-21 humano. La presente memoria descriptiva describe composiciones que comprenden un vehículo y un péptido, polipéptido o anticuerpo descrito en este documento.

20 [0046] Por lo tanto, la presente memoria descriptiva describe antagonistas a la actividad de IL-21, tales como anticuerpos anti-IL-21, que son útiles en el tratamiento terapéutico de enfermedades inflamatorias. Los anticuerpos anti-IL-21 reivindicados en la actualidad son útiles en el tratamiento de pancreatitis, diabetes de tipo I (IDDM), enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diverticulosis, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, espondilitis anquilosante, escleroderma, esclerosis sistémica, artritis psoriásica, osteoartritis, dermatitis atópica, vitiligo, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), linfoma cutáneo de linfocitos T (LCLT), síndrome de Sjogren, glomerulonefritis, nefropatía por IgA, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo al trasplante, dermatitis atópica, síndrome antifosfolípido y asma, y otras enfermedades autoinmunes.

30 [0047] La presente memoria descriptiva describe anticuerpos genéticamente alterados que son funcionalmente equivalentes a los anticuerpos que se han descrito anteriormente. Se prefieren anticuerpos modificados que proporcionan estabilidad y/o eficacia terapéutica mejorada. Los ejemplos de anticuerpos modificados incluyen aquellos con sustituciones conservadoras de restos aminoacídicos, y una o más supresiones o adiciones de aminoácidos que no alteran de manera significativa nocivamente la utilidad de unión del antígeno. Las sustituciones pueden variar de cambiar o modificar uno o más restos aminoacídicos para completar el rediseño de una región siempre y cuando se mantenga la utilidad terapéutica. Los anticuerpos se pueden modificar postraduccionalmente (por ejemplo, acetilación y fosforilación) o se pueden modificar sintéticamente (por ejemplo, la unión de un grupo de etiquetado).

40 [0048] Los anticuerpos alterados genéticamente también incluyen anticuerpos quiméricos que se obtienen a partir de los anticuerpos anti-IL-21. Preferiblemente, los anticuerpos quiméricos comprenden una región variable obtenida a partir de un ratón o rata y una región constante obtenida a partir de un ser humano de manera que el anticuerpo quimérico tenga una semividua mayor y sea menos inmunogénico cuando se administra a un sujeto humano. El procedimiento de fabricación de los anticuerpos quiméricos se conoce en la técnica. Las regiones variables de estos anticuerpos pueden conectarse con una región constante de una IgG humana para formar el anticuerpo quimérico deseado.

45 [0049] Preferiblemente, los anticuerpos anti-IL-21 alterados genéticamente descritos en este documento incluyen una versión humanizada de los anticuerpos descritos en este documento. El anticuerpo humanizado comprende CDR de una inmunoglobulina donante de ratón y estructuras de cadena pesada y de cadena ligera de una inmunoglobulina de aceptor humano. El procedimiento de fabricación de un anticuerpo humanizado se desvela en las patentes de Estados Unidos N° 5.301.101; 5.585.089; 5.693.762; y 6.180.370. Después, las CDR de estos anticuerpos pueden injertarse a cualquier estructura humana seleccionada, que se conocen en la técnica, para generar el anticuerpo humanizado deseado.

50 [0050] Los anticuerpos de la presente invención se pueden describir o especificar en términos del epítomo o los epítomos o la porción o porciones de un polipéptido de la presente invención que reconocen o se unen específicamente. El epítomo o los epítomos o la porción o porciones de polipéptido se pueden especificar como se describe en este documento, por ejemplo, por las posiciones N-terminal y C-terminal o por el tamaño en los restos aminoacídicos contiguos. Los anticuerpos de la presente invención también se pueden describir o especificar en cuando a su reactividad cruzada. La memoria descriptiva también describe anticuerpos que no se unen a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de un polipéptido en este documento.

55 [0051] La preclasificación de epítomos se refiere al uso de ensayos de unión competitivos para identificar pares de anticuerpos que son, o no son, capaces de unirse a la proteína IL-21 simultáneamente identificando así anticuerpos que se unen a la misma, o solapan epítomos sobre la proteína. Las familias de anticuerpos (o preclasificaciones) que tienen la misma especificidad de unión se pueden usar entonces para definir epítomos en el IL-21. Los experimentos de la preclasificación de epítomos proporcionan evidencias de que los epítomos

antigénicamente distintos están presentes. Sin embargo, por sí mismos, no identifican, o "mapean" el epítipo a una secuencia o ubicación aminoacídica específica sobre la molécula de proteína IL-21.

5 [0052] Se puede evaluar la competición de unión para cualquier par de anticuerpos o fragmentos. Por ejemplo, usando los reactivos de detección apropiados, la especificidad de unión de los anticuerpos o fragmentos de unión de cualquier especie/fuente se puede comparar con la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales desvelados en este documento. La preclasificación de epítipos se puede realizar con "anticuerpos aislados" o con sobrenadantes de cultivo celular. Con frecuencia, la preclasificación se realiza con la primera ronda de sobrenadantes clonales para guiar la selección de clones a ser desarrollados adicionalmente. Los anticuerpos que se comparan deben tener dominios de unión de antígeno sustancialmente homogéneos. En el caso de anticuerpos "biespecíficos" o "bifuncionales", la especificidad de unión de los dos sitios de unión diferentes han de ser evaluados o preclasificados independientemente.

15 [0053] La presente memoria descriptiva describe tanto anticuerpos específicos de receptor como anticuerpos específicos de ligando. Además de la unión competitiva de los anticuerpos, la preclasificación de epítipos también se puede usar para identificar anticuerpos ya sea a un receptor o a un ligando que interfieren competitivamente con la preclasificación de un ligando y su receptor. Con frecuencia, las propiedades favorables, de una familia (o preclasificación) de anticuerpos se pueden correlacionar con una unión a un epítipo específico definido por la preclasificación de epítipos.

20 [0054] Los experimentos de unión competitiva no miden directamente la afinidad de unión, sin embargo, los anticuerpos que se ensayarán deben unirse suficientemente de manera fuerte para actuar como competidores. Generalmente se diseñan condiciones experimentales para minimizar los efectos de las diferencias en la afinidad de unión.

25 [0055] También son útiles los anticuerpos IL-21 dirigidos contra antígeno en los ensayos de diagnóstico para la proteína IL-21, por ejemplo, para la detección de su expresión en las células específicas, tejidos o suero. Los anticuerpos asignados a diferentes preclasificaciones y capaces de unirse a diferentes porciones inmunogénicas, o epítipos, de IL-21 se pueden usar como los reactivos para ensayos de tipo sandwich. En un ensayo de tipo sandwich, el analito de la muestra de prueba se captura por un primer anticuerpo que se inmoviliza sobre un soporte sólido, y después se detecta por un segundo anticuerpo que también se une al analito, formado de esta manera un complejo de tres partes insoluble. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.376.110. El segundo anticuerpo se puede etiquetar por sí mismo con un resto detectable (ensayo de tipo sandwich directo) o puede medirse usando un anticuerpo de anti-inmunoglobulina que se etiqueta con un resto detectable (ensayo de tipo sandwich directo). Por ejemplo, un tipo de ensayo sandwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el resto detectable es una enzima.

35 [0056] Los anticuerpos de la presente invención se pueden someter a ensayo para la unión específica mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Se pueden usar muchos formatos de ensayo de unión competitiva diferentes para la preclasificación de epítipos. Los inmunoensayos que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como transferencia de western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de complemento-fijación, ensayos de inmunoradiometría, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, por nombrar algunos. Dichos ensayos son de rutina y se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel y col., 1994, Current Protocols in Molecular Biology. Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York). A continuación, se describen brevemente inmunoensayos ejemplares (pero no pretenden ser limitantes). Adicionalmente, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina, tal como el descrito en Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lañe (1988).

40 [0057] El Biacore es únicamente uno de una diversidad de formatos de ensayos que se usan rutinariamente para paneles de preclasificación de epítipos de anticuerpos monoclonales. Muchas referencias (por ejemplo, The Epitope Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology. Volumen 6-6 Glenn E. Morris ed.) describen procedimientos alternativos que se podrían usar para preclasificar los anticuerpos y se podría esperar proporcionar información idéntica con respecto a la especificidad de unión de los anticuerpos a la proteína IL-21. Al usar el sistema Biacore, los experimentos de preclasificación de epítipos se realizan con antígeno soluble y nativo. Los estudios de la preclasificación de epítipos se pueden realizar en un sistema BIACORE 1000® (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Se puede usar el software BIAlogue® v. 1.2 para programar los procedimientos de realización. Para el ejemplo de uso del Biacore para preclasificar anticuerpos monoclonales de ratón contra IL-21, el anticuerpo IgG Fc de cabra dirigido contra ratón policlonal (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) se puede inmovilizar covalentemente a un chip detector Biacore® CM5 y se usa para unir (capturar) el anticuerpo monoclonal principal de la serie de ensayo al chip. Después, los sitios de unión Fc no ocupados en el chip se bloquean usando un fragmento de IgG Fc policlonal (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Posteriormente, la proteína IL-21 se inyecta y se deja que se una específicamente al anticuerpo monoclonal principal capturado. El instrumento Biacore mide la masa de la proteína unida al chip detector, y la unión tanto del anticuerpo principal como

del antígeno IL-21 puede verificarse para cada ciclo. Después de la unión del anticuerpo principal y el antígeno al chip, el anticuerpo secundario soluble se inyecta y se deja que se una al antígeno pre-unido. Si el anticuerpo monoclonal secundario es capaz de unirse al antígeno IL-21 simultáneamente con el anticuerpo monoclonal principal, su unión se detecta por el Biacore. Sin embargo, si el anticuerpo monoclonal secundario no es capaz de unirse al antígeno IL-21 simultáneamente con el anticuerpo monoclonal principal, no se detecta ninguna unión adicional. Cada anticuerpo monoclonal se somete a una prueba contra sí mismo como un control negativo para establecer el nivel de la señal de fondo (de no enlace).

**[0058]** También se puede usar un formato ELISA competitivo sin etiqueta (LFC-ELISA) para preclasificar anticuerpos. Este procedimiento se describe por Nagata y col., J. Immuno Methods 292: 141-155, 2004. Este método para la preclasificación de epítomos utilizó IL-21 biotinilado. Para el ejemplo de la preclasificación de anticuerpos monoclonales de ratón contra IL-21, las placas de microtitulación se recubren en 100  $\mu$ l/pocillo con 1  $\mu$ g/ml de un anticuerpo específico IgG Fc- $\gamma$  de cabra dirigido contra ratón (Jackson ImmunoResearch) diluido en ELISA B (PBS, Tween 20 al 0,1%, BSA al 1%). Después de la unión de este anticuerpo de recubrimiento durante 3 horas a temperatura ambiente, cada medio acondicionado que contiene mAb se diluye en ELISA B para producir una concentración de mAb aproximada de 0,5  $\mu$ g/ml, y se deja que se una a las placas recubiertas con IgG de cabra dirigido contra ratón durante una noche a 4 °C (mAb#1). En paralelo, un segundo conjunto de medios acondicionados (mAb#2) se diluyen en tubos de ensayo de poliestireno a aproximadamente 0,5  $\mu$ g/ml de mAb en ELISA B, se mezclan con 50 ng/ml de antígeno IL-21 biotinilado y se incuban durante una noche a 4 °C. Después de la incubación de mAb#1 con el anticuerpo de recubrimiento, las placas se bloquean con un anticuerpo no relacionado para saturar los sitios de unión no ocupados sobre la placa. A la placa se le añaden las mezclas de mAb#2-biotina-IL-21 y se deja que se unan. Como un control para (no competición) en el ensayo, se añaden directamente 50 ng/ml de IL-21 biotinilado (sin pre-incubación con mAb#2) a los pocillos que contienen el mAb#1 inmovilizado. Después de la incubación con el complejo de IL-21-mAb#2 biotinilado, a la placa se le añade estreptavidina-HRP (Pierce, Rockford, IL) en 0,5  $\mu$ g/ml. Las placas se desarrollan con sustrato TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y la absorbencia de los pocillos individuales a 450 nm se mide con un lector de placas (Molecular Devices SpectraMax®340, Sunnyvale, CA). Si el mAb#1 se une a un epítomo diferente de mAb#2, el complejo de biotina-IL-21-mAb#2 se unirá a la placa dando como resultado una lectura de absorbencia alta. Si el mAb#1 se une al mismo epítomo que mAb#2, el complejo de biotina-IL-21-mAb#2 no se unirá a la placa, dando como resultado una lectura de absorbencia baja.

**[0059]** Los anticuerpos de la presente invención actúan como antagonistas de IL-21. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos (como se define en las reivindicaciones) que interrumpen las interacciones de receptor/ligando de IL-21 ya sea parcial o totalmente. La invención presenta anticuerpos específicos de ligando que evitan la activación del receptor. La invención incluye la neutralización de los anticuerpos que se unen al ligando y evitan la unión del ligando al receptor, así como anticuerpos que se unen al ligando, evitando en consecuencia la activación del receptor, pero no evitan que el ligando se una al receptor. La activación del receptor (es decir, la señalización) se puede determinar mediante técnicas descritas en este documento o de otra manera conocida en la técnica. Por ejemplo, la activación del receptor se puede determinar detectando la fosforilación (por ejemplo, tirosina o serina/treonina) del receptor o su sustrato mediante inmunoprecipitación seguida de la técnica transferencia de western o el análisis basado en luminex (por ejemplo, como se ha descrito anteriormente). La memoria descriptiva describe anticuerpos que inhiben el ligando o la actividad del receptor en al menos el 90%, al menos el 80%, al menos el 70%, al menos el 60% o al menos el 50% de la actividad en ausencia del anticuerpo.

#### Producción de Anticuerpos Anti-IL-21

**[0060]** Los anticuerpos para IL-21 pueden obtenerse, por ejemplo, usando el producto de un vector de expresión IL-21 o IL-21 aislado de una fuente natural como un antígeno. Los anticuerpos anti-IL-21 particularmente útiles "se unen específicamente" a IL-21. Se considera que los anticuerpos se unen específicamente si los anticuerpos muestran al menos una de las siguientes dos propiedades: (1) los anticuerpos se unen a IL-21 con nivel de umbral de la activación de unión, y (2) los anticuerpos no reaccionan de forma cruzada significativamente con polipéptidos relacionados con IL-21.

**[0061]** Con respecto a la primera característica, los anticuerpos se unen específicamente si se unen a un polipéptido, péptido o epítomo IL-21 con una afinidad de unión ( $K_a$ ) de  $10^6 M^{-1}$  o mayor, preferiblemente  $10^7 M^{-1}$  o mayor, más preferiblemente  $10^8 M^{-1}$  o mayor, y mucho más preferiblemente  $10^9 M^{-1}$  o mayor. La afinidad de unión de un anticuerpo se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51: 660,1949), o usando un instrumento biodetector disponible en el mercado (BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Con respecto a la segunda característica, los anticuerpos no reaccionan significativamente cruzados con las moléculas polipeptídicas relacionadas, por ejemplo, si detectan IL-21, pero no otros polipéptidos conocidos que usan un análisis de transferencia de Western convencional o ELISA de captura. Los ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos incluyen miembros conocidos de la familia IL-2.

**[0062]** Los anticuerpos anti-IL-21 monoclonales se pueden producir usando péptidos y polipéptidos que llevan el epítomo IL-21 antigénico. Los péptidos y polipéptidos que llevan el epítomo antigénico contienen una secuencia de

al menos nueve, o entre 15 a aproximadamente 30 aminoácidos contenidos en la SEQ ID NO: 2 u otra secuencia aminoacídica desvelada en este documento. Sin embargo, los péptidos o polipéptidos que comprenden una porción mayor de una secuencia aminoacídica, que contienen de 30 a 50 aminoácidos, o cualquier longitud hasta e incluyendo toda la secuencia aminoacídica de un polipéptido, también son útiles para inducir a los anticuerpos a que se unan con IL-21. Es deseable que la secuencia aminoacídica del péptido que lleva epítipo se seleccione para proporcionar una solubilidad sustancial en disolventes acuosos (es decir, la secuencia incluye residuos relativamente hidrófilos, mientras que los residuos hidrófobos típicamente se evitan). Además, las secuencias aminoacídicas que contienen residuos de prolina también pueden ser deseables para la producción de anticuerpos.

**[0063]** Los anticuerpos anti-IL-21 monoclonales se pueden generar mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales de roedor para antígenos específicos se pueden obtener mediante procedimientos conocidos (véase, por ejemplo, Kohler y col., *Nature* 256: 495 (1975), Coligan y col., (eds.), *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, páginas 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) ["Coligan"], Picklesley y col., "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli*", en *DNA Cloning 2: Expression Systems*. 2ª Edición, Glover y col., (eds.), página 93 (Oxford University Press 1995)).

**[0064]** La selección de aglutinantes de la presentación de una biblioteca de fragmentos de anticuerpos es una alternativa *in vitro* al desarrollo de anticuerpos monoclonales. El principio de la tecnología de presentación es el establecimiento de una conexión física entre un resto de unión y el material genético codificante. Este concepto se ha usado en varios modos desde la presentación de bibliotecas de proteínas y péptidos sobre superficies de bacteriófagos, bacterias y levadura a la presentación de proteínas unidas a ribosomas *in vitro* (véase, por ejemplo, Rothe y col., *FASEB J.* 20: 1599 (2006)). La presentación de anticuerpos sobre la superficie en un bacteriófago de cadena sencilla es la más desarrollada de estas tecnologías. El procedimiento típico usado para la presentación de anticuerpos es condensar el fragmento Fv de cadena sencilla o el Fd de cadena pesada (porción de cadena pesada de un Fab) con la proteína génica III de fagos. Las bibliotecas de anticuerpo pueden estar sin tratar, representando el repertorio inmune natural, o ser semi-sintéticas, lo que consiste en estructuras tomadas de plantillas humanas nativas combinadas con bibliotecas de secuencias de CDR sintéticas para aumentar la diversidad. Los fagos con actividades de unión específicas pueden aislarse de bibliotecas aleatorias de fragmentos de anticuerpos (particularmente Fab y scFv) o péptidos después de repetidas rondas de crecimiento y selección (véase, por ejemplo, Hoogenboom, *Nature Biotech.* 23: 1105 (2005)).

**[0065]** En una realización adicional, los anticuerpos de la presente invención también pueden generarse usando diversos procedimientos de presentación de fagos conocidos en la técnica. En los procedimientos de presentación de fagos, se muestran dominios de anticuerpo funcional sobre la superficie de partículas de fagos que llevan las secuencias polinucleotídicas que los codifican. En una particular, dichos fagos pueden utilizarse para mostrar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o biblioteca de anticuerpos de combinación (por ejemplo, humanos o murinos). Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que une el antígeno de interés pueden seleccionarse o identificarse con un antígeno, por ejemplo, usando un antígeno marcado o un antígeno unido o capturado a una superficie o lecho sólido. Los fagos usados en estos procedimientos son fagos típicamente filamentosos que incluyen dominios de unión fd y M13 expresados a partir de fagos con dominios de anticuerpos Fv estabilizados de Fab, Fv o disulfuro condensados de forma recombinante a la proteína génica III o génica VIII de fagos. Los ejemplos de los procedimientos de presentación de fagos que pueden usarse para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen los desvelados en Brinkman y col., *J. Immunol. Methods* 182: 41-50 (1995); Ames y col., *J. Immunol. Methods* 184: 177-186 (1995); Kettleborough y col., *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958 (1994); Persic y col., *Gene* 187: 9-18 (1997); Burton y col., *Advances in Immunology* 57: 191-280 (1994); la solicitud PCT N° PCT/GB91/01134; las publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes de Estados Unidos N° 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty y col., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) que describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) mediante el intercambio de cadenas (Marks y col., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), así como infección de combinación y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col., *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridomas de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

**[0066]** Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección de fagos, las regiones codificantes de anticuerpos de los fagos pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células de plantas, levadura, y bacterias, por ejemplo, como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, también pueden emplearse técnicas para producir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab)2 usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como los desvelados en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax y col., *BioTechniques* 12(6): 864-869. 1992; y Sawai y col., *AJRI* 34: 26-34, 1995; y Better y col., *Science* 240: 1041-1043, 1988.

**[0067]** Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando ratones transgénicos que sean incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que puedan expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina humana con cadenas ligeras y pesadas pueden introducirse de forma aleatoria o por recombinación homóloga en las células madre embrionarias de ratones. Como alternativa, además de los genes humanos de cadena ligera y pesada, la región humana variable, la región constante y la región de diversidad pueden introducirse en las células madre embrionarias de ratón. Los genes murinos de inmunoglobulina con cadenas ligeras y pesadas pueden dejar de ser funcionales, por separado o simultáneamente, tras la introducción de localizaciones de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la eliminación de células homocigóticas en la región JH evita la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocitos a fin de producir ratones quiméricos. Después, los ratones quiméricos se crían para obtener prole homocigótica que exprese anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de la forma normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, un polipéptido entero de la invención, o una porción del mismo. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse de los ratones inmunizados y transgénicos usando la tecnología convencional del hibridoma. Los transgenes de inmunoglobulina humana que alojan los ratones transgénicos se recomponen durante la diferenciación de linfocitos B, y posteriormente experimentan un cambio de clase y una mutación somática. Por lo tanto, utilizando una técnica de este tipo, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para obtener una vista general de esta tecnología para la producción de anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (Int Rev Immunol, 13: 65-93 (1995)).

**[0068]** Para un análisis detallado de esta tecnología de producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggermann y col., Year in Immuno., 7: 33 (1993); las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; las patentes de Estados Unidos N° 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; y 5.939.598. Además, las empresas, tales como Medarex, Inc. (Princeton, Nueva Jersey) y Genpharm (San Jose, Calif.) pueden proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando una tecnología similar a la que se ha descrito anteriormente. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 7.135.287.

**[0069]** Los anticuerpos de la invención se pueden producir mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o preferiblemente, mediante técnicas de expresión recombinantes. La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o fragmento, derivado o análogo del mismo, por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención, requiere la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifique el anticuerpo. Una vez que se ha obtenido el polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o una porción del mismo (que contenga preferiblemente el dominio variable de cadena pesada o ligera), de la invención, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo se puede producir mediante la tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por lo tanto, en este documento se describen procedimientos para preparar una proteína expresando un polinucleótido que contiene un anticuerpo que codifica una secuencia nucleotídica. Los procedimientos que se conocen bien por los expertos en la técnica se pueden usar para construir los vectores de expresión que contienen el anticuerpo que codifica las secuencias y las señales de control transcripcionales y traduccionales apropiadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. La memoria descriptiva describe vectores replicables que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica una molécula de anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera de la misma, o un dominio variable de cadena pesada o ligera, enlazado operablemente a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia nucleotídica que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 86/05807; la publicación PCT WO 89/01036; y la patente de Estados Unidos N° 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo se puede clonar en un vector de este tipo para obtener la expresión de toda la cadena pesada o ligera.

**[0070]** El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y después las células transfectadas se cultivan mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. Por lo tanto, la memoria descriptiva incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención, o una cadena pesada o ligera del mismo, enlazado operablemente a un promotor heterólogo. Para la expresión de los anticuerpos de cadena doble, los vectores que codifican tanto las cadenas pesadas como ligeras se pueden coexpresar en la célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla a continuación.

**[0071]** Se puede utilizar una diversidad de sistemas de vector de expresión de huésped para expresar las moléculas de anticuerpo de la invención. Dichos sistemas de expresión huésped representan vehículos mediante los cuales las secuencias de codificación de interés se pueden producir y purificar posteriormente, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o se transfectan con las secuencias codificantes nucleotídicas apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estas incluyen, pero sin limitación, microorganismos, tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN bacteriófago, ADN plasmídico o ADN cósmido que contienen secuencias codificantes de

anticuerpos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de plantas infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que alojan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores obtenidos a partir del genoma de las células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, MPSV, CMV, promotor tardío de adenovirus; promotor 7.5K del virus vaccinia). Preferiblemente, las células bacterianas, tales como *Escherichia coli*, y más preferiblemente, células eucarióticas, especialmente para la expresión de la molécula de anticuerpo recombinante completa, se usan para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero, tales como células de ovario de hámster Chino (CHO), junto con un vector, tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal para el citomegalovirus humano, el potenciador de CMV o promotor de MPSV es un sistema de expresión efectivo para los anticuerpos (Foecking y col., 1986, *Gene* 45: 101; Cockett y col., 1990, *Bio/Technology* 8: 2).

**[0072]** En los sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente una diversidad de vectores de expresión dependiendo del uso propuesto para la molécula de anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de esta proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero sin limitación, el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther y col., 1983, *EMBO J.* 2: 1791), en el cual la secuencia codificante de anticuerpos se puede ligar individualmente en el vector en el marco con la región de codificación lacZ de modo que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.* 11: 3101-3109, 1985; Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 24: 5503-5509, 1989); y similares. Los vectores pGEX también se pueden usar para expresar los polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante la adsorción y la enlace a unas perlas de glutatión-agarosa de matriz seguido de la elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir trombina o sitios de escisión del factor Xa proteasa de modo que el producto de gen diana clonado se puede liberar del resto GST.

**[0073]** En un sistema de insecto, el virus polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) se usa como un vector para expresar los genes extraños. El virus se desarrolla en las células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de anticuerpo se puede clonar individualmente en las regiones no esenciales (por ejemplo el gen de polihedrina) del virus y se coloca bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo el promotor de polihedrina).

**[0074]** En las células huésped de mamífero pueden usarse varios sistemas de expresión basados en virus. En casos en los que se usa un adenovirus como un vector de expresión, la secuencia codificante de anticuerpo de interés se puede ligar a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Después, este gen quimérico se puede insertar en el genoma de adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción de una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo de huéspedes infectados (por ejemplo, véase Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 81: 355-359, 1984). También se pueden requerir señales de iniciación específica para la traducción eficiente de secuencias codificantes de anticuerpos insertados. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y las secuencias adyacentes. Adicionalmente, el codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Estas señales de control traduccionales exógenas y los codones de inicio pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión se puede mejorar por la inclusión de elementos potenciadores de transcripción apropiados, terminadores de transcripción, etc. (véase Bittner y col., *Methods in Enzymol.* 153: 51-544, 1987).

**[0075]** Además, se puede seleccionar una cepa de célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico de la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos de proteínas pueden ser importantes para la función de la proteína. Las células huésped diferentes tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postraduccional y modificación de proteínas y productos génicos. Las líneas células apropiadas o los sistemas huésped se pueden seleccionar para asegurar la modificación correcta y el procesamiento de la proteína extraña expresada. Para este fin, se pueden usar células huésped eucarióticas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito principal, glicosilación y fosforilación del producto génico. Dichas células huésped de mamífero incluyen, pero sin limitación, CHO, VERO, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, y en particular, líneas de células de cáncer de mama, por ejemplo, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D y línea celular de la glándula mamaria normal, tal como, por ejemplo, CRL7030 y Hs578Bst.

**[0076]** Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la

expresión estable. Por ejemplo, se pueden diseñar líneas células que expresen de forma estable la molécula del anticuerpo. En lugar de usar los vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células huésped se pueden transformar con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, las células diseñadas se pueden dejar crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido, y después se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células se integren de forma estable al plásmido en sus cromosomas y se desarrollen formando focos que, a su vez, se pueden clonar y expandir en líneas celulares. Este procedimiento se puede usar ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresen la molécula de anticuerpo. Estas líneas celulares diseñadas pueden ser particularmente útiles en la determinación y evaluación de los compuestos que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

**[0077]** Se pueden usar varios sistemas de selección, que incluyen, pero sin limitación, los genes de la timidina cinasa del virus de herpes simple (Wigler y col., Cell 11: 223, 1977), se pueden emplear hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 202, 1992), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy y col., Cell 22: 817, 1980) en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. También, se puede usar la resistencia antimetabolito como base de la selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 357, 1980; O'Haré y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527, 1981); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072, 1981); neo, que confiere resistencia al aminoglicosido G-418 (Wu y Wu, Biotherapy. 3: 87-95, 1991; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596, 1993; Mulligan, Science 260: 926-932, 1993; y Morgan y Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217, 1993; TIB TECH 11 (5): 155-215, mayo de 1993; e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre y col., Gene 30: 147, 1984). Se describen procedimientos conocidos comúnmente en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que se pueden usar por Ausubel y col. (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli y col. (eds), 1994, Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY.; Colberre-Garapin y col., J. Mol. Biol. 150: 1, 1981.

**[0078]** Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo se pueden aumentar mediante la amplificación de vectores (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vectores que expresa el anticuerpo es amplificable, el aumento del nivel del inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada se asocia con el gen de anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse y col., Mol. Cell. Biol. 2: 257, 1983).

**[0079]** La célula huésped se puede co-transfectar con dos vectores de expresión, el primer vector que codifica un polipéptido obtenido a partir de cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido obtenido a partir de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, se puede usar un solo vector que codifica tanto los polipéptidos de cadena pesada como ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera se debe colocar antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, Nature 322: 52, 1986; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2197, 1980). Las secuencias codificantes para las cadenas pesadas y ligeras puede comprender ADNc o ADN genómico.

**[0080]** Una vez que una molécula de anticuerpo de la invención se ha expresado de forma recombinante, se puede purificar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica para purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad para el antígeno específico después de la Proteína A, y cromatografía de columna de dimensionamiento), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas.

**[0081]** Para los usos particulares, puede ser deseable preparar fragmentos de anticuerpos anti-IL-21. Dichos fragmentos de anticuerpos se pueden obtener, por ejemplo, mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener mediante la digestión de pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante procedimientos convencionales. A modo de ilustración, los fragmentos de anticuerpo se pueden producir mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S indicado F(ab')<sub>2</sub>. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol para producir fragmentos monovalentes 3.5S Fab'. Opcionalmente, la reacción de escisión se puede realizar usando un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de los enlaces de disulfuro. Como una alternativa, una escisión enzimática que usa pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos procedimientos se describen, por ejemplo, por Goldenberg, patente de Estados Unidos N° 4.331.647, Nisonoff y col., Arch Biochem. Biophys. 89: 230, 1960; Porter, Biochem. J. 73: 119, 1959; Edelman y col., in Methods in Enzymology Vol. 1, página 422 (Academic Press 1967), y por Coligan en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4.

**[0082]** También se pueden usar otros procedimientos para realizar escisiones de anticuerpos, tales como la

separación de las cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, escisión adicional de fragmentos, u otras técnicas enzimáticas, química o genéticas, siempre y cuando los fragmentos se unan al antígeno, que es reconocido por el anticuerpo intacto.

5 **[0083]** Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de las cadenas VH y VL. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe por Inbar y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69: 2659, 1972. Como alternativa, las cadenas variables se pueden enlazar por un enlace de disulfuro intermolecular o reticularse mediante productos químicos, tales como glutaraldehído (véase, por ejemplo, Sandhu, Crit. Rev. Biotech, 12: 437, 1992).

10 **[0084]** Los fragmentos Fv pueden comprender cadenas VH y VL que se conectan por un enlazador peptídico. Estas proteínas de enlace de antígeno de una sola cadena (scFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL que se conectan por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión que se introduce posteriormente en una célula huésped, tal como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una sola cadena de polipéptido con un péptido enlazador que conecta los dos dominios V. Se describen procedimientos para producir scFv, por ejemplo, por Whitlow y col., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 97 (1991) (también, véase, Bird y col. Science 242: 423, 1988, Ladner y col., patente de Estados Unidos N° 4.946.778, Pack y col. Bio/Technology 11: 1271, 1993 y Sandhu, anteriormente).

20 **[0085]** A modo de ilustración, se puede obtener un scFV exponiendo linfocitos al polipéptido IL-21 *in vitro*, y seleccionando bibliotecas de expresión de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, mediante el uso de una proteína o péptido IL-21 inmovilizado o marcado). Los genes que codifican péptidos que tienen dominios de unión al polipéptido IL-21 potencial pueden obtenerse explorando bibliotecas peptídicas aleatorias en los fagos (visualización de fagos) o en bacterias, tales como *E. coli*. Pueden obtenerse secuencias nucleotídicas que codifican los polipéptidos de varias maneras, tales como a través de mutagénesis aleatoria y síntesis polinucleotídica aleatoria. Estas bibliotecas de presentación de péptidos aleatorias pueden usarse para expresa los péptidos que interactúan con una diana conocida que puede ser una proteína o polipéptido, tal como un ligando o un receptor, una macromolécula biológica o sintética, o sustancias orgánicas o inorgánicas. Se conocen en la técnica técnicas para crear y detectar dichas bibliotecas de presentación de péptidos aleatorios (Ladner y col., patente de Estados Unidos N° 5.223.409, Ladner y col., patente de Estados Unidos N° 4.946.778, Ladner y col., patente de Estados Unidos N° 5.403.484, Ladner y col., patente de Estados Unidos N° 5.571.698, y Kay y col., Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press, Inc. 1996)) y están disponibles en el mercado bibliotecas de presentación de péptidos aleatorios y kits de detección de dichas bibliotecas, por ejemplo en CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA), y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Las bibliotecas de presentación de péptidos aleatorios pueden explorarse usando las secuencias IL-21 desveladas en este documento para identificar proteínas que se unen a IL-21.

35 **[0086]** Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido codificado con una única región determinante complementariamente (CDR). Se pueden obtener péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") construyendo genes que codifican la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable del ARN de células productoras de anticuerpos (véase, por ejemplo, Larrick y col., Methods: A Companion to Methods in Enzymology, 2: 106 (1991); Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", en Monoclonal Antibodies: Principles, Engineering and Clinical Applications. Ritter y col. (ads.), página 166 (Cambridge University Press 1995), y Ward y col., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch y col., (ads.), página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)).

40 **[0087]** Como alternativa, se puede obtener un anticuerpo anti-IL-21 a partir de un anticuerpo monoclonal "humanizado". Los anticuerpos monoclonales humanizados se producen transfiriendo regiones determinantes complementarias de ratón o de rata de cadenas variables pesada y ligera de la inmunoglobulina de ratón en un dominio humano variable. Después, los residuos típicos de anticuerpos humanos se sustituyen en las regiones de la estructura de las contrapartes de murino. El uso de componentes de anticuerpo obtenidos a partir de anticuerpos monoclonales humanizados obvia los problemas potenciales relacionados con la inmunogenicidad de regiones constantes de murino. Se describen técnicas generales para clonar dominios variables de inmunoglobulina de murino, por ejemplo, por Orlandi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 3833, 1989. Se describen técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados, por ejemplo, en Jones y col., Nature, 321: 522, 1986; Carter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285, 1992; Sandhu, Crit. Rev. Biotech., 12: 437, 1992; Singer y colaboradores, J. Immun., 150: 2844, 1993; Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols (Humana Press, Inc. 1995); Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies", en Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland y col., (eds.), páginas 399-434 (John Wiley & Sons, Inc. 1996); y en Queen y col., patente de Estados Unidos N° 5.693.762.

50 **[0088]** También es posible construir estructuras alternativas usando una colección de proteínas monoméricas para formar un dominio monomérico. Estos dominios monoméricos pueden ser suficientemente pequeños para penetrar los tejidos. Los dominios monoméricos pueden ser variantes de origen natural o sintéticas, o una combinación de los mismos. Los dominios monoméricos pueden formar multímeros de dos o más dominios. El dominio monomérico une una posición, análoga a los epítopos descritos en este documento, en una molécula diana.

En algunos casos, el multímero se puede formar a partir de una diversidad de dominios monoméricos (véase, por ejemplo la solicitud de patente de Estados Unidos 2004-0132028 y la solicitud de patente de Estados Unidos 2006-0177831).

5 **[0089]** Los anticuerpos descritos en este documento incluyen derivados que se modifican, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de tal forma que la unión covalente no evita que el anticuerpo se una al IL-21 o bloquee la activación del receptor. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados del anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, amidación, derivatización por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se pueden realizar mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero sin limitación, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

15 **[0090]** Un anticuerpo anti-IL-21 se puede conjugar con una etiqueta detectable para formar un inmunoconjugado anti-IL-21. Las etiquetas detectables adecuadas incluyen, por ejemplo, un radioisótopo, una etiqueta fluorescente, una etiqueta quimioluminiscente, una etiqueta enzimática, una etiqueta bioluminiscente u oro coloidal. Los procedimientos para hacer y detectar estos inmunoconjugados detectablemente etiquetados se conocen bien por los expertos en la técnica, y se describen con más detalle a continuación. La etiqueta detectable puede ser un radioisótopo que se detecta por auto-radiografía. Los isótopos que son particularmente útiles en este documento son  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  y  $^{14}\text{C}$ .

20 **[0091]** Los inmunoconjugados anti-IL-21 también se pueden etiquetar con un compuesto fluorescente. La presencia de un anticuerpo marcado por fluorescencia se determina por la exposición del inmunoconjugado a la luz de la longitud de onda apropiada y al detectar la fluorescencia resultante. Los compuestos de etiquetado fluorescente incluyen isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeriterina, ficocianina, alopocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

25 **[0092]** También es posible que los inmunoconjugados anti-IL-21 se puedan etiquetar de forma detectable acoplado un componente de anticuerpo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del inmunoconjugado marcado quimioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia que surge durante el transcurso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos de etiquetado quimioluminiscentes incluyen luminol, isoluminol, un éster de acridinio aromático, un imidazol, una sal de acridinio y un éster de oxalato.

30 **[0093]** De forma análoga, se puede usar un compuesto bioluminiscente para etiquetar inmunoconjugados anti-IL-21. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en los sistemas biológicos en los que una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. La presencia de una proteína bioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes que son útiles para el etiquetado incluyen luciferina, luciferasa y aequorina.

35 **[0094]** Como alternativa, los inmunoconjugados anti-IL-21 se pueden etiquetar de forma detectable al enlazar un componente del anticuerpo anti-IL-21 a una enzima. Cuando el conjugado de enzima anti-IL-21 se incuba en presencia del sustrato apropiado, el resto de la enzima reacciona con el sustrato para producir un resto químico que se puede detectar, por ejemplo, mediante un medio espectrofotométrico, fluorométrico o visual. Los ejemplos de enzimas que se pueden usar para etiquetar de forma detectable los inmunoconjugados poliespecíficos incluyen  $\beta$ -galactosidasa, glucosa oxidasa, peroxidasa y fosfatasa alcalina.

40 **[0095]** Los expertos en la técnica conocerán otras etiquetas adecuadas que se pueden emplear de acuerdo con la presente invención. La unión de los restos marcadores a los anticuerpos anti-IL-21 se puede lograr usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. La metodología típica en este respecto se describe por Kennedy y col., Clin. Chim. Acta 70: 1, 1976; Schurs y col., Clin. Chim. Acta 81: 1, 1977; Shih y col., Int'l J. Cancer 46: 1101, 1990; Stein y col., Cancer Res. 50: 1330, 1990; y Coligan, anteriormente.

45 **[0096]** Además, la conveniencia y versatilidad de la detección inmunoquímica se puede mejorar usando anticuerpos anti-IL-21 que se han conjugado con avidina, estreptavidina y biotina (véase, por ejemplo, Wilchek y col., (eds.), "Avidin-Biotin Technology", Methods In Enzymology, Vol. 184 (Academic Press 1990), y Bayer y col., "Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology", in Methods In Molecular Biology, Vol. 10, Manson (ed.), páginas 149-162 (The Humana Press, Inc. 1992).

50 **[0097]** Los procedimientos para realizar inmunoensayos están bien establecidos. Véase, por ejemplo Cook y Self, "Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays", en Monoclonal Antibodies: Production Engineering, and Clinical Application. Ritter y Ladyman (eds.), páginas 180-208, (Cambridge University Press, 1995), Perry, "The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology"; en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications. Birch y Lennox (eds.), páginas 107-120 (Wiley-Liss, Inc. 1995) y Diamandis, Immunoassay (Academic Press, Inc. 1996).

**[0098]** Los anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen semividas aumentadas *in vivo* se pueden generar modificando (por ejemplo, sustituyendo, suprimiendo o añadiendo) residuos aminoacídicos identificados por implicarse en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn (véase, por ejemplo, publicaciones internacionales N° WO 97/34631 y WO 02/060919, que se incorporan en este documento por referencia en su totalidad). Los anticuerpos o fragmentos de los mismos con semividas *in vivo* aumentadas se pueden generar uniendo a dichos anticuerpos o moléculas poliméricas de fragmentos de anticuerpos, tal como polietilenglicol de peso molecular alto (PEG). El PEG se puede unirse a los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos con o sin un enlazador multifuncional, ya sea a través de la conjugación específica de sitio del PEG, por ejemplo, al N- o C-terminal de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, o a través de los grupos épsilon-amino presentes en los residuos de lisina. Se usará la derivación polimérica lineal o ramificada que da como resultado una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación se supervisará estrechamente por SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la conjugación apropiada de las moléculas de PEG a los anticuerpos. El PEG no reaccionado se puede separar del anticuerpo de PEG mediante, por ejemplo, exclusión de tamaño o por cromatografía de intercambio iónico.

#### 15 Composiciones Farmacéuticas

**[0099]** La presente invención incluye adicionalmente composiciones farmacéuticas, que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo como se define en las reivindicaciones. La composición farmacéutica puede incluir agentes terapéuticos adicionales, incluyendo, pero sin limitación, agentes citotóxicos, una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocidal, un agente terapéutico o un ión de metal radioactivo. Una citotoxina o un agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracina-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil descabazina), agentes de alquilación (por ejemplo, mecloretamina, tioepa-clorambucilo, melfalano, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de difteria; una proteína, tal como un factor de necrosis tumoral,  $\alpha$ -IFN,  $\beta$ -IFN, factor del crecimiento nervioso, factor del crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno de tejido, un agente trombótico o un agente antiangiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina; o, modificadores de respuesta biológicos, tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador de la colonia de macrófagos de granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulador de la colonia de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

**[0100]** Para fines de terapia, se administran moléculas del anticuerpo anti-IL-21 y un vehículo farmacéuticamente aceptable a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz. Se dice que una combinación de una molécula terapéutica y un vehículo farmacéuticamente aceptable se administran en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor. Por ejemplo, un agente usado para tratar la inflamación es fisiológicamente significativo si su presencia alivia la respuesta inflamatoria.

**[0101]** Una composición farmacéutica que comprende anti-IL-21 puede proporcionarse en forma líquida, en aerosol o en forma sólida. Las formas líquidas se ilustran por soluciones inyectables y suspensiones orales. Las formas sólidas ejemplares incluyen cápsulas, comprimidos y formas de liberación controlada. La última forma se ilustra mediante minibombas osmóticas e implantes (Bremer y col., *Pharm. Biotechnol.* 10: 239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery", en "Drug Delivery Systems", Ranade and Hollinger (eds.), páginas 95-123 (CRC Press 1995); Bremer y col., "Protein Delivery with Infusion Pumps", en "Protein Delivery: Physical Systems", Sanders y Hendren (eds.), páginas 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey y col., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant", en "Protein Delivery: Physical Systems", Sanders y Hendren (eds.), páginas 93-117 (Plenum Press 1997)).

**[0102]** Los liposomas proporcionan un medio para suministrar polipéptidos terapéuticos a un sujeto por vía intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intramuscular, subcutánea o mediante administración oral, inhalación o administración intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodean compartimientos acuosos (véanse, en general, Bakker-Woudenberg y col., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Supl. 1): S61 (1993), Kim, *Drugs* 46: 618 (1993) y Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers", en "Drug Delivery Systems", Ranade and Hollinger (eds.), páginas 3-24 (CRC Press 1995)). Los liposomas son similares en composición a las membranas celulares y, como resultado, los liposomas pueden administrarse con seguridad y son biodegradables. Dependiendo del procedimiento de preparación, los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares, y los liposomas pueden variar de tamaño con diámetros en el intervalo de 0,02  $\mu$ m a

más de 10 µm. Puede encapsularse una diversidad de agentes en liposomas: reparto de agentes hidrófobos en las bicapas y reparto de agentes hidrófilos en el espacio o espacios acuosos internos (véase, por ejemplo, Machy y col., "Liposomes In Cell Biology And Pharmacology" (John Libbey 1987) y Ostro y col., American J. Hosp. Pharm. 46: 1576 (1989)). Además, es posible controlar la disponibilidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño del liposoma, el número de bicapas, la composición lipídica, así como las características carga y de superficie de los liposomas.

**[0103]** Como alternativa, pueden unirse diversos ligandos orientadores a la superficie del liposoma, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, carbohidratos, vitaminas y proteínas de transporte. Por ejemplo, los liposomas pueden modificarse con derivados galactosil-lipídicos de tipo ramificado para dirigirse a receptores de asialoglucoproteína (galactosa), que se expresan exclusivamente en la superficie de las células hepáticas (Kato y Sugiyama, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 14: 287 (1997); Murahashi y col., Biol. Pharm. Bull. 20: 259 (1997)). De forma similar, Wu y col., Hepatology 27: 772 (1998), han mostrado que marcar liposomas con asialofetuína conducía a una semivida plasmática acortada del liposoma y a una captación potenciada en gran medida de liposoma marcado con asialofetuína por los hepatocitos. Por otro lado, la acumulación hepática de liposomas que comprenden derivados de galactosil-lipídicos de tipo ramificado puede inhibirse mediante la preinyección de asialofetuína (Murahashi y col., Biol. Pharm. Bull. 20: 259 (1997)). Los liposomas de albúmina sérica humana poliaconitilada proporcionan otro enfoque para dirigir liposomas a células hepáticas (Kamps y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 94: 11681 (1997)). Además, Geho y col., patente de Estados Unidos Nº 4.603.044, describen un sistema de suministro de vesícula liposómica dirigido a hepatocito que tiene especificidad por los receptores hepatobiliares asociados a las células metabólicas especializadas del hígado.

**[0104]** En un enfoque más general para la orientación a tejido, se premarcan las células diana con anticuerpos biotinilados específicos de un ligando expresado por la célula diana (Harasym y col., Adv. Drug Deliv. Rev. 32: 99 (1998)). Después de la eliminación plasmática del anticuerpo libre, se administran liposomas conjugados con estreptavidina. En otro enfoque, se unen directamente los anticuerpos de orientación a liposomas (Harasym y col., ibid (1998)).

**[0105]** Los polipéptidos y anticuerpos pueden encapsularse en liposomas usando técnicas convencionales de microencapsulación de proteína (véanse, por ejemplo, Anderson y col., Infect. Immun. 31: 1099, 1981, Anderson y col., Cancer Res. 50: 1853, 1990 y Cohen y col., Biochim. Biophys. Acta 1063: 95,1991, Alving y col. "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies", en "Liposome Technology", 2ª edición, Vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993), Wassef y col., Meth. Enzymol. 149: 124, 1987). Como se ha apreciado anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener una diversidad de componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden comprender derivados lipídicos de polietilenglicol (Allen y col., Biochim. Biophys. Acta 1150: 9, 1993).

**[0106]** Las microesferas poliméricas degradables se han diseñado para mantener altos niveles sistémicos de proteínas terapéuticas. Las microesferas se preparan a partir de polímeros degradables, tales como poli(lactida-co-glicolida) (PLG), polianhídridos, poli(ortoésteres) o polímeros de acetato de etilvinilo no biodegradables, en las que se atrapan las proteínas en el polímero (Gombotz y Pettit, Bioconjugate Chem. 6: 332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery", en "Drug Delivery Systems", Ranade and Hollinger (eds.), páginas 51-93 (CRC Press 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery", en "Protein Delivery: Physical Systems", Sanders y Hendren (eds.), páginas 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus y col., Science 281: 1161, 1998; Putney y Burke, Nature Biotechnology 16: 153, 1998; Putney, Curr. Opin. Chem. Biol. 2: 548, 1998). Las nanoesferas recubiertas con polietilenglicol (PEG) pueden proporcionar también vehículos para la administración intravenosa de proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, Gref y col., Pharm. Biotechnol. 10: 167, 1997).

**[0107]** Pueden preverse otras formas de dosificación por los expertos en la técnica, como se muestra, por ejemplo, por Ansel y Popovich, "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", 5ª edición (Lea&Febiger 1990), Gennaro (ed.), "Remington's Pharmaceutical Sciences", 19ª edición (Mack Publishing Company 1995), y por Ranade y Hollinger, "Drug Delivery Systems" (CRC Press 1996).

**[0108]** Las composiciones farmacéuticas pueden suministrarse en forma de un kit que comprende un envase que comprende un polipéptido neutralizante anti-IL-21. Los polipéptidos terapéuticos pueden proporcionarse en forma de una solución inyectable para dosis únicas o múltiples, o en forma de un polvo estéril que se reconstituirá antes de la inyección. Como alternativa, un kit de este tipo puede incluir un dispersor de polvo seco, un generador de aerosol líquido o un nebulizador para la administración de un polipéptido terapéutico. Un kit de este tipo puede comprender adicionalmente información escrita acerca de las indicaciones y el uso de la composición farmacéutica.

**[0109]** Puede proporcionarse una composición farmacéutica que comprende anticuerpos anti-IL-21 en forma líquida, en un aerosol o en forma sólida. Las formas líquidas se ilustran por soluciones inyectables, aerosoles, gotas, soluciones tópicas y suspensiones orales. Las formas sólidas ejemplares incluyen cápsulas, comprimidos y formas de liberación controlada. La última forma se ilustra por minibombas osmóticas e implantes (Bremer y col., Pharm. Biotechnol. 10: 239, 1997; Ranade, "Implants in Drug Delivery", en "Drug Delivery Systems", Ranade and Hollinger (eds.), páginas 95-123 (CRC Press 1995); Bremer y col., "Protein Delivery with Infusion Pumps", en "Protein

Delivery: Physical Systems", Sanders y Hendren (eds.), páginas 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey y col., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant", en "Protein Delivery: Physical Systems", Sanders y Hendren (eds.), páginas 93-117 (Plenum Press 1997)). Otras formas sólidas incluyen cremas, pastas, otras aplicaciones tópicas y similares.

5

#### Usos Terapéuticos para los Anticuerpos Anti-IL-21

**[0110]** El IL-21 es una citocina obtenida de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que es importante para la inmunidad mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup>, la activación de las células NK, y respuestas humorales óptimas, tal como producción de anticuerpos y maduración de linfocitos B. Se ha demostrado que IL-21 induce varias quimiocinas y citocinas proinflamatorias, tales como IL-18, IL-15, IL-5, IL-6, TNFR11, sCD25 y RANTES. IL-21 también induce una respuesta de fase aguda en primates no humanos y humanos. La expresión aumentada del receptor del receptor de IL-21 se ha mostrado en la epidermis en pacientes con esclerosis sistémica (Distler y col., *Arthritis & Rheumatism* 52: 865-864, 2004) y fibroblastos sinoviales de la artritis reumatoide (Jungel y col., *Arthritis & Rheumatism* 50: 1468-1476, 2004). Además, los ratones NOD diabéticos, autoinmunes, han incrementado la expresión del receptor de IL-21 (King y col., *Cell* 117: 265-277, 2004). Se ha demostrado que la expresión de IgG e IL-21 aumentan en el modelo de ratón BXSB- Yaa el cual desarrolla una enfermedad similar al lupus eritematoso autoinmune (Ozaki y col., *J. Immunol.* 173: 5361-5371, 2004); la expresión del IL-21 es mayor en ratones Sanroque propensos a lupus (Vinuesa y col., *Nature* 435: 452, 2005); la expresión del IL-21 es mayor en pacientes con enfermedad de Crohn (Monteleone y col., *Gastroenterology* 128: 687-694, 2005).

10

15

20

**[0111]** Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IL-21 se refiere a una cantidad de anticuerpo que se administra a un sujeto que es efectiva para prevenir, retardar, reducir o inhibir un síntoma o actividad biológica asociada con una enfermedad o trastorno. La administración puede consistir de una sola dosis o múltiples dosis, y se puede proporcionar junto con otras composiciones farmacéuticas.

25

**[0112]** La presente invención proporciona anticuerpos IL-21 y composiciones farmacéuticas como se define en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones autoinmunes, tales como pancreatitis, diabetes de tipo I (IDDM), enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diverticulosis, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, espondilitis anquilosante, escleroderma, esclerosis sistémica, artritis psoriásica, osteoartritis, dermatitis atópica, vitiligo, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), linfoma cutáneo de linfocitos T (LCLT), síndrome de Sjogren, glomerulonefritis, nefropatía por IgA, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo al trasplante, dermatitis atópica, síndrome antifosfolípido y asma, y otras enfermedades autoinmunes.

30

35

#### Dermatitis por Contacto

**[0113]** La dermatitis por contacto alérgica se define como una reacción inmune mediada por linfocitos T a un antígeno que entra en contacto con la piel. Se cree que la población de linfocitos T CLA<sup>+</sup> está implicada en la iniciación de la dermatitis puesto que las respuestas de linfocitos T dependientes de alérgeno se confinan en gran medida para la población CLA<sup>+</sup> de las células (véase Santamaria-Babi, L.F., y col., *J Exp Med* 181: 1935, (1995)). En datos recientes se ha descubierto que únicamente la memoria de los linfocitos T (CD45RO<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> CLA<sup>+</sup> y no CD8<sup>+</sup> proliferan y producen tanto citocinas de tipo 1 (IFN- $\gamma$ ) como de tipo 2 (IL-5) en respuesta al níquel, un alérgeno de hipersensibilidad de contacto común. Adicionalmente, las células que expresan CLA en combinación con CD4, CD45RO (memoria) o CD69 aumentan después de la estimulación específica de níquel y expresan los receptores de quimiocina CXCR3, CCR4, CCR10 pero no CCR6. Véase Moed H., y col., *Br J Dermatol* 51: 32, (2004).

40

45

**[0114]** En los modelos animales, se ha demostrado que la dermatitis por contacto alérgica es dependiente de linfocitos T y que los linfocitos T sensibles a alergia migran al sitio de aplicación del alérgeno. Véase generalmente: Engeman T.M., y col., *J Immunol* 164: 5207, (2000); Ferguson T.A. & Kupper T.S., *J Immunol* 150: 1172, (1993); y Gorbachev A.V. & Fairchild R.L., *Crit Rev Immunol.* 21: 451 (2001).

50

#### Dermatitis Atópica

**[0115]** La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad inflamatoria de la piel crónicamente recurrente con una incidencia creciente notablemente durante las últimas décadas. Clínicamente, la DA se caracteriza por placas y pápulas, frecuentemente erosionados, altamente pruríticos que muestran un curso recurrente crónico. El diagnóstico de la DA se basa principalmente en los hallazgos clínicos principales y secundarios. Véase Hanifin J. M., *Arch Dermatol* 135: 1551, (1999). La histología revela espongiosis, hiperparaqueratosis y paraqueratosis focal en lesiones agudas, mientras que la hiperplasia epidérmica marcada con hiperparaqueratosis y paraqueratosis, acantosis/hipergranulosis e infiltración perivascular de la dermis con linfocitos y células mastoides abundantes son las marcas distintivas de las lesiones crónicas.

55

60

**[0116]** Los linfocitos T desempeñan una función central en el inicio de respuestas inmunes locales en los tejidos y la evidencia sugiere que los linfocitos T infiltrantes de piel en particular, pueden desempeñar una función clave en el inicio y el mantenimiento de respuestas inmunes no reguladas en la piel. Aproximadamente el 90% de los

65

linfocitos T infiltrantes en los sitios inflamatorios cutáneos expresan el antígeno asociado con linfocitos cutáneo que se une a E-selectina, una molécula de adhesión inducible en el endotelio (revisado en Santamaria-Babi L.F., y col., Eur J Dermatol 14: 13, (2004)). Se ha documentado un aumento significativo de los linfocitos T CLA+ circulantes entre los pacientes con DA en comparación con los individuos de control (Véase Teraki Y., y col., Br J Dermatol 143: 373 (2000), mientras que otros han demostrado que los linfocitos T CLA+ de memoria de los pacientes con DA responden preferencialmente al extracto de alérgeno en comparación con la población de CLA (Véase Santamaria-Babi, L.F. y col., J Exp Med. 181: 1935. (1995)). En los seres humanos, la patogénesis de los desórdenes atópicos de la piel se han asociado con aumentos en los linfocitos T CLA+ que expresan niveles aumentados de citocinas de tipo Th-2, como IL-5 e IL-13. Véase Akdis M., y col., Eur J Immunol 30: 3533 (2000); y Hamid Q., y col., J Allergy Clin Immunol 98: 225 (1996).

**[0117]** Los ratones NC/Nga desarrollan espontáneamente lesiones similares a la DA que la DA humana paralela en muchos aspectos, incluyendo cursos clínicos y signos, histopatología e inmunopatología cuando se alojan en condiciones sin patógenos no especificados (sin SPF) a aproximadamente 6-8 semanas de edad. Por el contrario, los ratones NC/Nga mantenidos en condiciones SPF no desarrollan lesiones cutáneas. Sin embargo, el inicio de las lesiones cutáneas espontáneas y el comportamiento de rascado puede sincronizarse en los ratones NC/Nga alojados en una instalación SPF mediante inyección intradérmica semanal de antígeno de ácaro de polvo crudo. Véase Matsuo H y col., Allergy 58: 139 (2003). Por lo tanto, el desarrollo de la DA en NC/Nga es un modelo útil para la evaluación de terapéuticas novedosas para el tratamiento de la DA.

**[0118]** Además del modelo NC/Nga de DA espontánea, la sensibilización epicutánea de los ratones usando OVA también se puede usar como un modelo para inducir el engrosamiento epidérmico y dérmico dependiente de antígeno con un infiltrado mononuclear en la piel de los ratones sensibilizados. Esto normalmente coincide con los niveles elevados en el suero de IgE total y específico, sin embargo, en este modelo no tiene lugar normalmente una disfunción o prurito de barrera en la piel. Véase Spergel J.M. y col., J Clin Invest, 101: 1614, (1998). Este protocolo se puede modificar a fin de inducir la desregulación de la barrera de la piel y la pruritis al sensibilizar ratones transgénicos DO11.10 OVA TCR con OVA. El aumento del número de linfocitos T específicos de antígeno que podrían reconocer el antígeno sensibilizante pueden aumentar el nivel de inflamación en la piel para inducir el comportamiento de rascado visible y la liquenificación/picazón de la piel.

#### Artritis

**[0119]** La artritis, incluyendo osteoartritis, artritis reumatoide, articulaciones artríticas como un resultado de una lesión, y similares, son afecciones inflamatorias comunes que se beneficiarían del uso terapéutico de los anticuerpos antiinflamatorios y los polipéptidos de unión. Por ejemplo, la artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica que afecta a todo el cuerpo y es una de las formas más comunes de artritis. Se caracteriza por la inflamación de la membrana que recubre la articulación, lo cual causa dolor, rigidez, calor, enrojecimiento e hinchazón. Las células inflamatorias liberan enzimas que pueden digerir hueso y cartílago. Como resultado de la artritis reumatoide, el revestimiento de la articulación inflamada, el sinovio, puede invadir y dañar el hueso y el cartílago lo que conduce al deterioro de la articulación y un dolor severo, entre otros efectos fisiológicos. La articulación implicada puede perder su forma y alineación, dando como resultado dolor y pérdida de movimiento.

**[0120]** La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad mediada inmune caracterizada particularmente por la inflamación y el daño del tejido posterior que conduce a una discapacidad severa y un aumento de la mortalidad. Se producen localmente una diversidad de citocinas en las articulaciones reumatoides. Numerosos estudios han demostrado que el IL-1 y TNF-alfa, dos citocinas pro-inflamatorias prototípicas, desempeñan una función importante en los mecanismos implicados en la inflamación sinovial y en la destrucción progresiva de la articulación. De hecho, la administración de inhibidores de TNF-alfa e IL-1 en pacientes con AR ha conducido a una mejora notable de los signos clínicos y biológicos de la inflamación y a una reducción de signos radiológicos de la erosión ósea y la destrucción del cartílago. Sin embargo, a pesar de estos resultados favorables, un porcentaje significativo de pacientes no responde a estos agentes, sugiriendo que también están implicados otros mediadores en la patofisiología de la artritis (Gabay, Expert. Opin. Biol. Ther. 2(2): 135-149, 2002).

**[0121]** Existen varios modelos animales para artritis reumatoide conocidos en la técnica. Por ejemplo, en el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA), los ratones desarrollan artritis inflamatoria crónica que se asemeja estrechamente a la artritis reumatoide humana. Puesto que la CIA comparte características inmunológicas y patológicas similares con la AR, esto hace un modelo ideal para la clasificación de compuestos antiinflamatorios humanos potenciales. El modelo CIA es un modelo bien conocido en ratones que depende tanto de una respuesta inmune como una respuesta inflamatoria, a fin de que ocurra. La respuesta inmune comprende la interacción de los linfocitos B y los linfocitos T CD4+ en respuesta al colágeno, que se administra como antígeno, y conduce a la producción de anticuerpos de anti-colágeno. La fase inflamatoria es el resultado de las respuestas de tejido de los mediadores de la inflamación, como una consecuencia de algunos de estos anticuerpos con reacción cruzada al colágeno nativo del ratón y que inactivan la cascada de complemento. Una ventaja del uso del modelo CIA es que se conocen los mecanismos básicos de la patogénesis. Se han identificado los epítomos de linfocitos T y linfocitos B relevantes en el colágeno de tipo II, y se han determinado diversos parámetros inmunológicos (por ejemplo, hipersensibilidad de tipo retardada y anticuerpo anti-colágeno) e inflamatorios (por ejemplo, citocinas, quimiocinas y

enzimas que degradan la matriz) en relación con la artritis mediada inmune, y de esta manera se pueden usar para evaluar la eficacia del compuesto de prueba en el modelo CIA (Wooley, Curr. Opin. Rheum. 3: 407-20, 1999; Williams y col., Immunol. 89: 9784-788, 1992; Myers y col., Life Sci 61: 1861-78, 1997; y Wang y colaboradores. Immunol. 92: 8955-959, 1995).

**[0122]** La administración de los anticuerpos anti-IL-21 a estos ratones modelo CIA se usa para evaluar el uso de anticuerpos anti-IL-21 para mejorar los síntomas y alterar la evolución de la enfermedad.

#### Enfermedad Inflamatoria del Intestino (EII)

**[0123]** En Estados Unidos aproximadamente 500.000 personas sufren de la enfermedad inflamatoria del intestino (EII) que puede afectar al colon y al recto (colitis ulcerosa) o a ambos, al intestino delgado y el grueso (enfermedad de Crohn). La patogénesis de estas enfermedades no está clara, ya que implican la inflamación crónica de los tejidos afectados. La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria del intestino grueso, comúnmente llamado el colon, caracterizada por la inflamación y ulceración de la mucosa o el revestimiento interno del colon. Esta inflamación hace que el colon se vacíe frecuentemente, dando como resultado diarrea. Los síntomas incluyen pérdida de las heces y calambres abdominales asociados, fiebre y pérdida de peso. Aunque la causa exacta de la CU es desconocida, una investigación reciente sugiere que las defensas naturales del cuerpo están actuando contra las proteínas del cuerpo, cuyo cuerpo cree que son extrañas (una "reacción autoinmune"). Tal vez debido a que se asemejan a las proteínas bacterianas de los intestinos, estas proteínas pueden instigar o estimular el proceso inflamatorio que comienza a destruir el revestimiento del colon. Según el revestimiento del colon se destruye, se forman úlceras que liberan mucosidad, pus y sangre. La enfermedad comienza normalmente en el área rectal y se puede extender eventualmente a través de todo el intestino grueso. Los episodios repetidos de inflamación conducen al engrosamiento de la pared del intestino y recto con tejido cicatrizante. Puede darse la muerte del tejido del colon o sepsis con enfermedad grave. Los síntomas de la colitis ulcerosa varían en gravedad y su inicio puede ser gradual o repentino. Los ataques pueden ser provocados por muchos factores, incluyendo infecciones respiratorias o estrés.

**[0124]** Aunque actualmente no existe cura disponible para la CU, los tratamientos se centran en suprimir el proceso inflamatorio anormal en el revestimiento del colon. Están disponibles tratamientos que incluyen inmunosupresores de corticosteroides (por ejemplo, azatioprina, mercaptopurina y metotrexato) y aminosalicilatos para tratar la enfermedad. Sin embargo, el uso a largo plazo de los inmunosupresores, tales como corticosteroides y azatioprina puede dar como resultado efectos secundarios graves, incluyendo adelgazamiento de los huesos, cataratas, infección, y efectos en la médula ósea y el hígado. En los pacientes cuyas terapias actuales no son exitosas, la cirugía es una opción. La cirugía implica la eliminación del colon y el rector completos.

**[0125]** Existen varios modelos animales que pueden imitar parcialmente la colitis ulcerosa crónica. El modelo más usado ampliamente es el modelo de colitis inducida con ácido 2,4,6-trinitrobensulfónico/etanol (TNBS) que induce la inflamación crónica y la ulceración en el colon. Cuando el TNBS se introduce en el colon de ratones susceptibles por vía de instilación intra-rectal, induce la respuesta inmune mediada por linfocitos T en la mucosa del colon, lo que conduce en este caso a una inflamación de la mucosa masiva caracterizada por la infiltración densa de linfocitos T y macrófagos por toda la pared completa del intestino grueso. Además, esta imagen histopatológica se acompaña por la imagen clínica de la pérdida de peso progresiva (emaciación), diarrea con sangre, prolapso rectal y engrosamiento de la pared del intestino grueso (Neurath y colaboradores Intern. Rev. Immunol. 19: 51-62, 2000).

**[0126]** Otro modelo de colitis usa dextran sulfato sódico (DSS), que induce una colitis aguda que se manifiesta por diarrea con sangre, pérdida de peso, acortamiento del colon y ulceración de la mucosa con infiltración de neutrófilos. La colitis inducida por DSS se caracteriza histológicamente por la infiltración de células inflamatorias en la lámina propia, con hiperplasia linfoide, daño en la cripta focal y ulceración epitelial. Se cree que estos cambios se desarrollan debido a un efecto tóxico de DSS sobre el epitelio y por la fagocitosis de las células de la lámina propia y la producción de TNF-alfa e IFN-gamma. A pesar del uso común, los problemas severos con respecto a los mecanismos de la enfermedad inducida por DSS sobre la relevancia de la enfermedad humana permanecen sin resolver. El DSS es considerado como un modelo independiente de linfocitos T debido a que se observa en animales deficientes de linfocitos T, tales como ratones SCID.

**[0127]** La administración de anticuerpos anti-IL-21 a estos modelos de transferencia de linfocitos T TNBS, DSS o CD4 se puede usar para evaluar el uso de antagonistas de IL-21 con el fin de mejorar los síntomas y alterar la evolución de la enfermedad gastrointestinal. El IL-21 puede desempeñar una función en la respuesta inflamatoria de la colitis, y la neutralización de la actividad de IL-21 al administrar los antagonistas de IL-21 es una metodología terapéutica potencial para la EII.

#### Psoriasis

**[0128]** La psoriasis es una afección crónica de la piel que afecta más de siete millones de americanos. La psoriasis ocurre cuando nuevas células de la piel crecen anormalmente, dando por resultado parches inflamados, hinchados y escamosos de la piel vieja no se cambia lo suficientemente rápido. La placa psoriásica, la forma más

común, se caracteriza por parches inflamados de piel ("lesiones") cubiertos con escapas blancas plateadas. La psoriasis se puede limitar a pocas placas o implicar áreas moderadas a extensas de la piel, presentándose más comúnmente sobre cuero cabelludo, rodillas, codos y el torso. Aunque es sumamente visible, la psoriasis no es una enfermedad contagiosa. La patogénesis de las enfermedades implica la inflamación crónica de los tejidos afectados. Los anticuerpos anti-IL-21 de la presente invención, podrían servir como una terapia terapéutica valiosa para reducir la inflamación y los efectos patológicos de la psoriasis, otras enfermedades cutáneas inflamatorias, alergias de la piel y la mucosa, y enfermedades relacionadas.

**[0129]** La psoriasis es un desorden inflamatorio mediado por linfocitos T de la piel que pueden causar una incomodidad considerable. Es una enfermedad para la que no existe cura y afecta personas de todas las edades. La psoriasis afecta aproximadamente dos por ciento de las poblaciones de Europa y América del Norte. Aunque los individuos con psoriasis leve frecuentemente pueden controlar su enfermedad con agentes tópicos, más de un millón de pacientes en el mundo requieren tratamientos con luz ultravioleta o terapia inmunosupresora sistémica. Desafortunadamente, la inconveniencia y riesgos de la radiación ultravioleta y la toxicidad de muchas terapias limitan su uso a largo plazo. Además, los pacientes normalmente tienen recurrencia de la psoriasis, y en algunos casos rebote, poco después de detener la terapia inmunosupresora. Los anticuerpos anti-IL-21 se pueden someter a ensayo usando un modelo recientemente desarrollado de psoriasis en base al modelo de transferencia CD4+CD45RB (Davenport y col., *Internat. Immunopharmacol.*, 2: 653-672, 2002).

**[0130]** Además de otros modelos de enfermedades descritos en este documento, la actividad de los anticuerpos anti-IL-21 en el tejido inflamatorio obtenido de lesiones psoriáticas humanas se puede medir *in vivo* usando un modelo de ratón inmunodeficiente combinado grave (SCID). Se han desarrollado varios modelos de ratón en los cuales las células humanas se implantan en los ratones inmunodeficientes (colectivamente denominados como modelos de xenoinjerto); véase, por ejemplo, Cattar AR, Douglas E, *Leuk. Res.* 18: 513-22, 1994 y Flavell, DJ, *Hematological Oncology* 14: 67-82, 1996. Como un modelo de xenoinjerto *in vivo* para la psoriasis, el tejido de la piel psoriática humana se implanta en un modelo de ratón SCID, y se estimulan con un antagonista apropiado. Además, pueden usarse otros modelos animales con psoriasis en la técnica para evaluar los antagonistas de IL-21, tales como injertos de la piel psoriática humana implantados en el modelo de ratón AGR129, y se estimulan con un antagonista apropiado (por ejemplo, véase, Boyman, O. y col., *J Exp. Med.* Publicación en línea Nº 20031482, 2004). De forma similar, se pueden usar tejidos o células obtenidas a partir de colitis humana, EII, artritis u otras lesiones inflamatorias en el modelo SCID para evaluar las propiedades antiinflamatorias de los anticuerpos anti-IL-21 descritos en este documento.

**[0131]** La eficacia del tratamiento se mide y se evalúa estadísticamente como el aumento del efecto antiinflamatorio dentro de la población tratada a través del tiempo usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Algunos procedimientos ejemplares incluyen, pero sin limitación, la medición, por ejemplo, en un modelo de psoriasis, espesor epidérmico, el número de células inflamatorias en la dermis superior, y los grados de paraqueratosis. Dichos procedimientos se conocen en la técnica y se describen en este documento. Por ejemplo, véase Zeigler, M. y col., *Lab Invest* 81: 1253, 2001; Zollner, T. M. y col., *J. Clin. Invest.* 109: 671, 2002; Yamanaka, N. y col., *Microbio. Immunol.* 45: 507, 2001; Raychaudhuri, S. P. y col., *Br. J. Dermatol.* 144: 931, 2001; Boehncke, W. H y col., *Arch. Dermatol. Res.* 291: 104, 1999; Boehncke, W. H y col., *J. Invest. Dermatol.* 116: 596, 2001; Nickoloff, B. J. y col., *Am. J. Pathol.* 146: 580, 1995; Boehncke, W. H y col., *J. Cutan. Pathol.* 24: 1, 1997; Sugai, J., M. y col., *J. Dermatol. Sci.* 17: 85, 1998; y Villadsen L.S. y col., *J. Clin. Invest.* 112: 1571, 2003. La inflamación también se puede supervisar a través del tiempo usando procedimientos bien conocidos, tales como citometría de flujo (o PCR) para cuantificar el número de células inflamatorias o lesionales presentes en una muestra, puntuación (pérdida de peso, diarrea, sangrado rectal, longitud del colon) para EII, puntuación de la enfermedad de las patas y puntuación de la inflamación para el modelo CIA RA.

#### Lupus Eritematoso Sistémico

**[0132]** El lupus eritematoso sistémico (LES) es un trastorno relacionado con un complejo inmune caracterizado por la producción del anticuerpo IgG crónico dirigido en los propios antígenos ubicuoso (por ejemplo anti-dsDNA). Los efectos del LES son sistémicos, en lugar de localizados en un órgano específico. Se han asociado múltiples sitios cromosómicos con la enfermedad y pueden contribuir hacia aspectos diferentes de la enfermedad, tales como anticuerpos anti-dsDNA y glomerulonefritis. Se ha demostrado que los linfocitos T CD4+ desempeñan una parte activa en modelos de ratón de LES (Horwitz, *Lupus* 10: 319-320, 2001; Yellin y Thienel, *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2: 24-37, 2000). La función para los linfocitos T CD8+ no se define claramente, sino que existen evidencias que sugieren que la función "supresora" de los linfocitos T CD8+ se deteriora en los pacientes con lupus (Filaci y col., *J. Immunol.*, 166: 6452-6457, 2001; Sakane y col., *J. Immunol.*, 137: 3809-3813, 1986).

**[0133]** Se ha mostrado que el IL-21 modula las respuestas de anticuerpos actuando directamente sobre los linfocitos B (Mehta y col., *J. Immunol.*, 170: 4111-4118, 2003; Ozaki y col., *Science*, 298: 1630-1634, 2002; Suto y col., *Blood*, 100: 4565-4573, 2002). Por ejemplo, Ozaki y col., (*J. Immunol.* 173: 5361, 2004) demostraron que en ratones BXSb-Yaa, un modelo para LES, hay un nivel de IL-21 en suero elevado. Además, puesto que el IL-21 mejora la actividad de los linfocitos T CD8+, la administración de anticuerpos anti-IL-21 podría proporcionar una función supresora de linfocitos T más robusta en los pacientes con lupus donde esa función se compromete.

**[0134]** Los anticuerpos anti-IL-21 se pueden administrar junto con otros agentes ya en uso en la autoinmunidad que incluyen moduladores inmunes, tales como IFN $\gamma$ , NOVANTRONE®, ENBREL®, REMICADE®, LEUKINE® e IL-2. El establecimiento del nivel de dosis óptimo y la programación para los anticuerpos anti-IL-21 se hace mediante una diversidad variedad de medios, incluyendo el estudio de la farmacocinética y la farmacodinámica de los anticuerpos anti-IL-21; la determinación de dosis eficaces en modelos animales, y evaluación de la toxicidad de los anticuerpos anti-IL-21. Después, las mediciones farmacocinéticas directas hechas en primates y en ensayos clínicos pueden usarse para predecir las dosis teóricas en pacientes que logran niveles de anticuerpos anti-IL-21 plasmáticos que son de magnitud y duración suficiente para lograr una respuesta biológica en los pacientes.

**[0135]** La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

## **EJEMPLO**

### **Ejemplo 1 - Preparación de Proteínas IL-21**

**[0136]** La proteína IL-21 se produjo como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos N° US 2006-0134754 y el documento WO 04/055168. En resumen, una secuencia nucleotídica IL-21 se optimizó y se insertó en un vector de expresión de *E. coli* que se depositó en la ATCC con N° de Acceso PTA-4853. El vector de expresión se introdujo en la cepa *E. coli* W3110 (ATCC con N° de Acceso 27325).

**[0137]** Las células huésped se fermentaron mediante cepas de *E. coli* en desarrollo que expresan IL-21 en un medio adecuado en un cultivo de un matraz oscilante en un medio adecuado y puede suplementarse con carbohidratos, tales como fructosa, glucosa, galactosa, lactosa y glicerol. Al cultivo se le puede añadir isopropil tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0,1 a 2,0 mM.

**[0138]** Tras la fermentación, las células se cosecharon por centrifugación, se resuspendieron en un tampón de homogeneización y se homogeneizaron. Después, el homogenado se recogió, se resuspendió una solución que contenía guanidina y el sobrenadante que contiene IL-21 solubilizado se decantó y se retuvo. La concentración del IL-21 en la fracción solubilizada se determinó por HPLC de fase inversa. Una vez que los cuerpos de inclusión se solubilizaron y se desnaturalizaron en una solución de guanidina que contenía un agente reductor, entonces el IL-21 reducido se oxidó en una etapa de renaturalización controlada. Esta etapa implicó la dilución en un tampón de repliegado que contenía clorhidrato de arginina, sales y un sistema de retirada de óxido.

**[0139]** La purificación de la proteína IL-21 puede incluir la purificación de IL-21 usando cromatografía de interacción hidrófoba. El IL-21 puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía de intercambio catiónico de alto rendimiento. Los procedimientos de purificación de IL-21 pueden comprender concentrar y realizar un intercambio de tampón de la proteína. Esta etapa está diseñada para concentrar el eluato de la columna de intercambio catiónico de alto rendimiento e intercambiarla en un tampón de formulación. La combinación de eluato de columna final se concentra para aumentar la concentración de IL-21. La purificación adicional de IL-21 para eliminar las impurezas restantes y los contaminantes puede ser deseable. Por ejemplo, puede usarse una columna de intercambio aniónico para reducir el nivel de endotoxinas.

### **Ejemplo 2 - Preparación de Proteínas del Receptor de IL-21**

**[0140]** La proteína del heterodímero del receptor de IL-21 (también denominado como  $\alpha$ 11 o IL-21r) puede producirse como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos N° US 2002-0137677.

**[0141]** En resumen, se construye un vector que expresa un heterodímero h $\alpha$ 11/hIL2R $\gamma$  humano secretado. En esta construcción, el dominio extracelular de h $\alpha$ 11 se condensa al dominio CH1 de IgG  $\gamma$ 1. El dominio CH1 se clona en un vector de expresión de mamíferos. El dominio CL1 de la cadena ligera humana  $\kappa$  se clona en un vector de expresión de mamíferos.

**[0142]** Se hace una construcción que tiene un  $\alpha$ 11 humano condensado a CH1, y el vector se secuencia para confirmar que la fusión es correcta. También puede construirse una construcción separada que tiene hIL2R $\gamma$  condensado a CL1. El vector resultante se secuencia para confirmar que la fusión IL-2R $\gamma$ /CL1 humana es correcta.

**[0143]** Las fusiones del receptor  $\alpha$ 11 humano (IL-21r) e IL-2R $\gamma$  humano se coexpresan. Cada vector de expresión se cotransfecta en células huésped de mamífero mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Las células transfectadas se seleccionan durante 10 días en metotrexato (MTX) y G418 (Gibco/BRL) durante 10 días. La agrupación resultante de transfectantes se selecciona de nuevo en MTX y G418 durante 10 días.

**[0144]** La agrupación resultante de células doblemente seleccionadas se usa para generar una proteína. Se usan factorias (Nunc, Dinamarca) de esta agrupación para generar un medio acondicionado. Este medio acondicionado sin suero se pasa sobre una columna de proteína A y se eluye en fracciones. Las fracciones que

tenían la concentración más alta se agrupan y se dializan (10 kD de PM de corte) frente a PBS. Finalmente, el material dializado se somete a análisis aminoacídico (AAA). El receptor humano  $\alpha 11$ /receptor humano IL-2R $\gamma$  soluble purificado puede usarse para evaluar su capacidad para competir por la unión del ligando humano  $\alpha 11$ , mediante un ensayo de proliferación de BaF3.

**[0145]** B. El dominio extracelular de  $\alpha 11$  humano condensado a Fc9 (región Fc de  $\gamma 1$  humano (numeración Kabat 221-447; Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health and Human Serv., Bethesda, MD, 1991)) con un marcador GluGlu (Grussenmeyer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7952-4, 198)) en el término carboxilo se generó mediante PCR por solapamiento. El ADNc se insertó en pZMP31 (descrito en la solicitud de patente de Estados Unidos US2003/023414; un vector híbrido que tiene un potenciador citomegalovirus y un promotor del virus del sarcoma mieloproliferativo) mediante recombinación en levadura. El dominio extracelular de la cadena  $\gamma$  común del receptor de IL2 humano se condensó a Fc9 con un marcador 6XHis en el término carboxilo de Fc9. Esta construcción se insertó en pZMP21z mediante recombinación en levadura usando el mismo procedimiento que se describe para  $\alpha 11$  Fc9CEE. Las construcciones resultantes se secuenciaron para verificar que los insertos eran correctos. Ambos plásmidos se transfirieron en células CHO adaptadas sin suero en suspensión por electroporación y se seleccionaron en un medio PFCHO sin proteína (BioWhittaker) sin hipoxantina y timidina con 200 ng/mL de zeomicina añadidos. Después, estas células se seleccionaron en el mismo medio más concentraciones en aumento de metotrexato hasta que las células eran resistentes tanto a 1  $\mu$ M de metotrexato como a 200 ng/mL de zeomicina. Las células se ensayaron para la producción del receptor heterodimérico de IL21 mediante análisis por transferencia de Western por la presencia tanto de EE como sus marcadores.

**[0146]** El diseño de zcytor26f2 (dominio extracelular de la cadena  $\gamma$  común del receptor de IL2 humano se condensó a Fc9 con un marcador 6XHis) es de tal forma que tres marcadores están disponibles para su purificación (GluGlu, His y Fc), de los cuales dos se utilizan para una mejor discriminación de un heterodímero de los dos contaminantes homodiméricos. Todas las moléculas que contenían un dominio Fc (contaminantes homodiméricos y diana heterodimérica) se capturaron y se purificaron a partir de los componentes de célula huésped y productos de medios relacionados. La agrupación que contenía todas las especies se concentró y se inyectó sobre una columna de exclusión del tamaño apropiado (Superdex 200) para eliminar los agregados. La agrupación SEC que contenía tres especies (dos homodímeros y un heterodímero) se sometió a cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) usando el contraión de Ni en condiciones de carga y elución altamente discriminatorias. La agrupación de elución por IMAC contenía un heterodímero altamente puro, con solo contaminación homodimérica residual. El tampón de agrupación por IMAC se intercambió en un tampón de formulación usando cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200), que también elimina cualquier producto de agregación residual. Esta proteína heterodimérica IL-21 se usó como un comparador al probar la actividad neutralizando del anticuerpo.

### **Ejemplo 3 - Preparación de Anticuerpos Monoclonales IL-21**

**[0147]** Se preparan anticuerpos monoclonales de rata inmunizando 4 ratas hembra Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, Wilmington, MA), con la proteína IL-21 recombinante purificada. A cada una las ratas se les administra una inyección inicial por vía intraperitoneal (IP) de 25  $\mu$ g de la proteína recombinante purificada en adyuvante completo de Freund (Pierce, Rockford, IL) seguido de inyecciones estimulantes IP de 10  $\mu$ g de la proteína recombinante purificada en adyuvante incompleto de Freund cada dos semanas. Siete días después de la administración de la segunda inyección estimulante, los animales se desangran y se recoge el suero.

**[0148]** Las muestras séricas de rata IL-21-específico se caracterizan por ELISA usando 1  $\mu$ g/ml de la proteína del receptor de IL-21 recombinante purificada como la diana del anticuerpo específico. Los ensayos por ELISA comprenden la preparación del antígeno IL-21, la cubrición de los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, la adición de los sueros de rata de interés a los pocillos y la incubación durante un periodo de tiempo para permitir que los anticuerpos en los sueros de rata se unan al antígeno. A los pocillos se les añade un segundo anticuerpo de detección (que reconoce los anticuerpos de interés contenidos en los sueros de rata) conjugado a un compuesto detectable, tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano o fosfatasa alcalina). Un experto en la técnica tendrá conocimiento de los parámetros que pueden modificarse para aumentar la señal detectada, así como otras variaciones de los ensayos ELISA conocidos en la técnica. Para un análisis adicional con respecto a los ensayos ELISA véase, por ejemplo, Ausubel y col., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York a 11.2.1.

**[0149]** Los esplenocitos se cosechan a partir de una sola rata de alta titulación y se condensan a células de mieloma SP2/0 (ratón) usando PEG 1500 en un procedimiento de fusión individual (proporción de fusión 4:1, esplenocitos con respecto a células de mieloma, "Antibodies: A Laboratory Manual", E. Harlow y D.Lane, Cold Spring Harbor Press). Después de 9 días de crecimiento post-fusión, se identificaron agrupaciones de hibridoma productoras de anticuerpos específicos por ELISA usando 500 ng/ml de la proteína IL-21 recombinante como diana de anticuerpos específicos. Las agrupaciones de hibridomas positivas se analizan adicionalmente para comprobar su capacidad de bloquear la actividad proliferativa celular ("ensayo de neutralización") de la proteína IL-21 purificada recombinante en células BaF3 que expresan el receptor de la secuencia de IL-21.

**[0150]** Las agrupaciones de hibridomas que producen resultados positivos por el "ensayo de neutralización" se clonan al menos dos veces mediante dilución limitante.

5 **[0151]** Los anticuerpos monoclonales producidos por clones se caracterizan de varias formas, incluyendo unión (es decir, determinar si cada anticuerpo puede inhibir la unión de cualquier otra unión), afinidad relativa y neutralización. Los anticuerpos monoclonales purificados del medio de cultivo tisular se caracterizan por su capacidad de bloquear la actividad proliferativa celular ("ensayo de neutralización") de IL-21 purificado recombinante en células Baf3 que expresan las secuencias receptoras. Los anticuerpos monoclonales "neutralizantes" se identifican de esta manera.

10 **[0152]** Las muestras se tomaron a partir de agrupaciones de hibridomas y se ensayaron usando tanto el ensayo de neutralización como un ELISA de valoración directa. En este ensayo, una muestra se valoró usando cuatro diluciones seriadas para ver qué clon puede mantener la lectura de DO más alta. Usando los resultados tanto de los ensayos de neutralización como de valoración, se seleccionaron clones específicos a partir de cada pocillo principal inicial para seguir adelante. Se realizó otra detección de neutralización que realizó todas estas muestras en el mismo ensayo y en este punto el número de líneas celulares se redujo a cuatro elegidos. Se sometieron a una ronda adicional de clonación para asegurar la homogeneidad del cultivo y se detectaron usando el ensayo ELISA directo. Después de un ensayo de valoración más, se seleccionaron dos clones de IL-21 finales y se denominaron 268.5.1.11.42.1.4.3.9 (IL-21 de rata dirigido contra ratón, ATCC con N° de Acceso PTA-10394) y 272.21.1.3.4.2 (IL-21 de rata dirigido contra humano, ATCC con N° de Acceso PTA-10395). Los anticuerpos monoclonales producidos por estos clones de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo del 90% de medio de Dulbecco modificado de Iscove con 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de penicilina, y 100 µg/ml de sulfato de estreptomina, y suero de clon fetal I al 10% (Hyclone Laboratories). Los clones pueden propagarse iniciando cultivos en  $2 \times 10^5$  células/ml y manteniéndose entre  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$  células/ml a 37 °C y CO al 5-6%. Las células pueden adaptarse a condiciones sin suero tras transferencias posteriores. Las células que se congelan se almacenan en suero al 90%, DMSO al 10% y se almacenan en una fase de vapor de un congelador de nitrógeno líquido.

30 **Ejemplo 4 - Detección en Suero de Anticuerpos Monoclonales**

**[0153]** La actividad de los anticuerpos anti-IL-21 se mide usando un bioensayo de potencia basado en células. El bioensayo utiliza una línea celular de indicador de BaF3 que se diseñó para expresar el receptor de IL-21 (IL-21R) a través de la transfección estable con ADNc de IL-21R. Las células transfectadas IL-21R/BaF3 dependen en gran medida de rIL-21 o IL-3 para su crecimiento y, en su ausencia, son incapaces de proliferar y experimentar apoptosis en 24 horas. En el bioensayo basado en células, las células transfectadas IL-21R/BaF3 se incuban con concentraciones variables de suero que contiene anticuerpos anti-IL-21 y se mide la proliferación celular posterior.

35 **Ejemplo 5 - Caracterización de Anticuerpos**

40 **Preclasificación de epítomos**

**[0154]** Los estudios de preclasificación de epítomos se realizan en un sistema Biacore 1000™ (Biacore, Uppsalla, Suecia). El procedimiento se programan usando un Lenguaje de Definición de Métodos (MDL) y se realizan usando el software Biacore Control, v 1.2. El anticuerpo policlonal Fc de IgG de cabra dirigido contra ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) se inmoviliza covalentemente a un chip detector Biacore CM5 y se usa para unir (capturar) el anticuerpo monoclonal principal de la serie de ensayo al chip. Después, los sitios de unión Fc desocupados en el chip se bloquean usando un fragmento policlonal Fc de IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Posteriormente, se inyecta IL-21 y se deja que se una específicamente al anticuerpo monoclonal principal capturado. El instrumento Biacore mide la masa de la proteína unida a la superficie del chip detector y, por lo tanto, la unión la unión tanto del anticuerpo principal como del antígeno de IL-21 se verifica para cada ciclo. Tras la unión del anticuerpo principal y el antígeno al chip, se inyecta un anticuerpo monoclonal de la serie de ensayo como el anticuerpo secundario, y se deja que se una al antígeno unido previamente. Si el anticuerpo monoclonal secundario es capaz de unir el antígeno de IL-21 simultáneamente con el anticuerpo monoclonal principal, se detecta un aumento de la masa sobre la superficie del chip, o la unión. Sin embargo, si el anticuerpo monoclonal secundario no es capaz de unir el antígeno de IL-21 simultáneamente con el anticuerpo monoclonal principal, no se detecta masa adicional, ni unión. Cada anticuerpo monoclonal ensayado contra sí mismo se usa como el control negativo para establecer el nivel de la señal de fondo (no unión). Los datos se compilan usando el software BioEvaluation 3.2 RCI, después se cargan en Excel™ para realizar el procesamiento de los datos.

60 **Transferencia de Western**

**[0155]** La capacidad de los anticuerpos monoclonales neutralizantes a partir de los clones para detectar IL-21 desnaturalizado y reducido/desnaturalizado de dos fuentes se evalúa usando un formato de transferencia de Western. Se usa un anticuerpo policlonal de ratón conocido para detectar IL-21 en un formato de transferencia de Western como un control positivo.

**[0156]** La proteína IL-21 se carga sobre geles Bis-Tris NuPAGE al 4-12% (Invitrogen, Carlsbad, CA) en un tampón de muestra no reductor o reductor (Invitrogen) junto con estándares de peso molecular (SeeBlue; Invitrogen), y se realiza la electroforesis. Tras la electroforesis, la proteína se transfiere del gel, las manchas de nitrocelulosa se bloquean durante una noche y se exponen a cada anticuerpo. Después, las manchas se sondan con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano rusticano; IgG-HRP de oveja dirigido contra ratón (Amersham: Piscataway, NJ) para los anticuerpos monoclonales e Ig-HRP de burro dirigido contra conejo (Amersham) para los anticuerpos policlonales. El anticuerpo unido se detecta usando un reactivo quimioluminiscente (Lumi-Light Plus Reagent: Roche, Mannheim, Alemania) y se registraron imágenes de las manchas en un Lumi-Imager (Mannheim-Boehringer).

#### **Ejemplo 6 - Modelo de Ratón DTH**

**[0157]** Las respuestas DTH son respuestas inmunes clásicas que se inician por linfocitos T CD4+ y están mediadas por linfocitos T<sub>H</sub>1 neutrófilos y macrófagos. Una respuesta DTH es un buen indicador de una respuesta mediada por linfocitos T CD4+. Los ratones se inmunizan por vía subcutánea con proteína de ovalbúmina de pollo (OVA) en cualquiera de 2 adyuvantes, RIBI o CFA. Esta fase se denomina la fase de sensibilización (días 0-6). Las mediciones de la oreja se toman siete días después. Después, a los ratones se les inyecta en la oreja PBS de control (oreja izquierda) u OVA (oreja derecha). Esta fase se denomina la fase de estimulación (días 7-8). Las respuestas inmunes generadas para OVA inducen inflamación en la oreja dando como resultado un aumento del grosor de la oreja en 24 horas en la oreja tratada con OVA, pero no en la oreja tratada con PBS. Esto se mide usando calibradores.

**[0158]** Los ratones C57BL/6 (n = 8/grupo) se inmunizan en el lomo con 100 µg de ovalbúmina de pollo (OVA) emulsificada en adyuvante RIBI (Corixa, Seattle, WA) en un volumen total de 200 µl. Se añaden 0,5 mg/ml de ovalbúmina a un solo vial de RIBI y se agitó vorticialmente de forma vigorosa durante 2 minutos para formar una emulsión que se usa para inyectar a los ratones. Siete días después de la inmunización, los ratones se inyectaron con 10 µl de PBS en la oreja izquierda (control) y con 10 µg de OVA en PBS en la oreja derecha en un volumen de 10 µl. El grosor de la oreja de todos los ratones se mide antes de la inyección a los ratones en la oreja (medición 0). El grosor de la oreja se mide 24 horas después de la estimulación. La diferencia en el grosor de la oreja entre la medición 0 y la medición en 24 horas se calcula y se refleja en la inflamación en el oído. Los grupos de ratones se inyectan con PBS o una concentración diferente de anticuerpo anti-IL-21 por vía intraperitoneal a partir de los días 0-6 (fase de sensibilización) o a partir de los días 7-8 (fase de estimulación). La inyección en el día 7 y 8 se da 2 horas antes de medir el grosor de la oreja en los puntos de tiempo de 0 y 24 horas. Al final del periodo de 24 horas, una vez que se midió el grosor de la oreja, los oídos se cortaron y se colocaron en formalina para su análisis histológico.

#### **Ejemplo 7 - Modelo de Ratón para Esclerosis Múltiple**

**[0159]** Para probar si anti-IL-21 tiene algún efecto en la esclerosis múltiple, la capacidad de los anticuerpos anti-IL-21 para inhibir la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), se prueba un modelo de ratón para MS. Se usa el modelo de inmunización del péptido 35-55 de glicoproteína de oligodendrocito de mielina (MOG) bien caracterizado en ratones C57BL/6. El experimento se realiza para determinar que el anticuerpo anti-IL-21 puede retardar y/o inhibir los registros de la enfermedad en EAE ya sea al inhibir la presentación del antígeno mediado por DC o al potenciar las respuestas de linfocitos T CD8. La ausencia de las respuestas de linfocitos T CD8 eficaces en este modelo exacerba la EAE (Malipiero y col., Eur. J. Immunol., 27: 3151-3160, 1997). El comienzo retardado de la enfermedad en el modelo de EAE en una manera dependiente de la dosis sugiere que el uso del anticuerpo anti-IL-21 puede ser beneficioso en MS.

**[0160]** La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) es un modelo de ratón para MS. En un modelo de este tipo, los ratones C57BL/6 se inmunizan con 100 µg de péptido MOG (MOG35-55) o 100 µg de proteína MOG recombinante emulsionada en el adyuvante RIBI. Se añaden dos mililitros de una preparación de 0,5 mg/ml del MOG35-55 en PBS a un vial de RIBI y se agita vorticialmente de forma vigorosa para emulsionar la solución o se prepara una proporción 1:1 de MOG recombinante en DFA. Los lomos de los ratones se rasuran y se inyectan 100 µg de MOG/CFA por vía s.c en los lomos de los ratones. Se toma el peso de los ratones 2 días antes y cada día después de la inmunización. Después, los ratones se inyectan el día 2 i.v. con 200 µl de toxina pertussis (PT), una concentración final de 200 ng/ratón. Los ratones se supervisan a diario para obtener los registros clínicos. Los grupos de ratones se inyectan i.p. con 200 µl de PBS, 100 µg de BSA, 10 µg-200 µg de anticuerpo anti-IL-21 en un volumen de 200 µl de los días 0-20, o 3 veces a la semana durante 3 semanas. El peso de los ratones, los registros clínicos e incidencias se evalúan y representan en una gráfica para su análisis.

#### **Ejemplo 8 - Modelo de Ratón en Colitis y Psoriasis CD4+CD45RBhi (CD25-)**

**[0161]** La transferencia de linfocitos T CD4+ CD45RBhi o CD4+CD25- a ratones SCID singénicos da como resultado colitis en los ratones. La cotrasferencia de linfocitos T reguladores (CD4+CD25+ o CD4+CD45RBlo) inhibe esta colitis. Después de la transferencia de linfocitos T CD4+CD25- a ratones, si se inyecta adicionalmente a los

ratones enterotoxina B estafilocócica (SEB), los ratones no sólo desarrollan colitis, sino también psoriasis. El anticuerpo anti-IL-21 se administra los días 0-21 después de la transferencia celular y se controlan los síntomas de colitis y psoriasis. La inhibición de la puntuación psoriática o colitis (histología) indica que el anticuerpo IL-21 puede inhibir estas enfermedades autoinmunes.

**[0162]** Se aíslan bazos y nódulos linfáticos inguinales de ratones B10.D2. Se forman suspensiones monocelulares y se cuentan. Usando el sistema Miltenyi Bead, se clasifican las células CD25+ por selección positiva. Se tiñen las células con CD25-PE (BD Pharmingen) a dilución 1:100 y se incuban durante 15 minutos. Se elimina por lavado el exceso de anticuerpo y se incuban las células con 10 µl de perlas anti-PE/106 células durante 20 minutos. Se lavan las células con PBS y se pasan por una columna LS (Miltenyi Biotech). Se retienen las células que pasan por la columna (CD25-) para análisis adicional. Se añade un cóctel de enriquecimiento de CD4 (Stem Cell Technologies) (1:100) a estas células CD25- y se incuban durante 15 minutos. Se lavan las células con PBS. Se añade una dilución 1:10 de tetrámero anti-biotina a las células durante 15 minutos seguido de un coloide magnético (60 µl/106 células) durante 15 minutos (todo de Stem Cell Technologies). Se pasan las células a través de una columna de selección negativa (0,5", Stem Cell Technologies). Las células que pasan a través son las células CD4+CD25-. Se analiza la pureza usando citometría de flujo. Se inyectan 0,4 x 10<sup>6</sup> células i.v. en ratones SCID CB-17 no infectados con un volumen total de 200 µl. Se inyectan i.p. en los ratones 10 µg de SEB al día siguiente (d1). Se siguen los síntomas de psoriasis y colitis durante 2-5 semanas. Los grupos de ratones se inyectan i.p. con PBS, 100 µg de BSA o 10-200 µg de IL-21 desde los días 1-20, o 3 veces a la semana durante 3 semanas.

**[0163]** La inhibición de los síntomas psoriáticos y de colitis en ratones tratados con anticuerpo anti-IL-21 indica que los anticuerpos anti-IL-21 pueden inhibir los síntomas autoinmunes en este modelo de psoriasis y colitis.

#### **Ejemplo 9 - Módulo de Ratón de Hipersensibilidad por Contacto**

**[0164]** La hipersensibilidad por contacto puede inducirse en ratones usando una diversidad de alérgenos de contacto que incluyen dinitrofluorobenceno (DNFB) y oxazolona. Los ratones se sensibilizan por vía tópica con el alérgeno en un vehículo de acetona y aceite de oliva y después se exponen en la oreja con el alérgeno en sólo aceite de oliva. El cambio en el grosor de la oreja es una medición de la respuesta inmune contra el alérgeno. Los anticuerpos anti-IL-21 se administran ya sea en la fase de sensibilización (días 0-5) o durante la fase de estimulación (días 5-6). La inhibición del grosor de la oreja por IL-21 indica una función para IL-21 en la inhibición de hipersensibilidad por contacto.

**[0165]** El lomo de los ratones C57B1/6 pinta con DNFB al 0,5% en acetona:aceite de oliva (4:1) o acetona:aceite de oliva únicamente el día 0. El día 5, el grosor de la oreja de los ratones se mide usando calibradores y se estimulan las orejas de los ratones sólo con aceite de oliva (control) o DNFB al 0,25% en aceite de oliva al gotear una solución de 25 µl en la oreja. El cambio en el grosor de la oreja se mide el día 6 y la inflamación se calcula como una diferencia del grosor de la oreja entre el d5 y el d6. Los grupos de los ratones se inyectan i.p. con PBS o 10-100 µg de anticuerpos anti-IL-21 en cualquiera de los días 0-5 o los días 5-6.

**[0166]** La inhibición del grosor de la oreja por anticuerpos anti-IL-21 demuestra que los anticuerpos anti-IL-21 pueden ser útiles en la inhibición de la hipersensibilidad por contacto.

**[0167]** Los esplenocitos se cosechan y se agrupan a partir de dos ratones Balb/c de alta valoración y se condensan en células de mieloma de ratón P3-X63-Ag8.653 usando PEG 1450 en un solo procedimiento de fusión (proporción de fusión de 2:1, esplenocitos con respecto a células de mieloma, "Antibodies: A Laboratory Manual", E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Press). Después de 9 días de crecimiento post-fusión, las agrupaciones de hibridomas productores de anticuerpos específicos se identifican por ELISA directo y de captura usando una proteína IL-21 recombinante, no marcada y Fc marcada de IgG humana, como diana de anticuerpo específico. Las agrupaciones de hibridomas positivas se analizan adicionalmente para comprobar su capacidad para bloquear la actividad proliferativa celular ("ensayo de neutralización") de la proteína IL-21 purificada recombinante en células BaF3 que expresan la secuencia del receptor de IL-21. Los anticuerpos monoclonales purificados a partir de un medio de cultivo tisular se caracterizan por su capacidad para bloquear la actividad proliferativa celular ("ensayo de neutralización") del IL-21 purificado recombinante en células BaF3 que expresan las secuencias receptoras. Los anticuerpos monoclonales "neutralizantes" se identifican de esta manera.

**[0168]** Las agrupaciones de hibridomas que producen resultados positivos mediante el "ensayo de neutralización" y los formatos ELISA se clonan al menos dos veces por dilución limitante. En estos ensayos, las muestras se valoran usando cuatro diluciones seriadas para ver qué clon mantendrá la lectura de DO más alta. Usando los resultados tanto de los ensayos de neutralización como de valoración, se seleccionan dos clones específicos a partir de cada pocillo principal inicial para análisis adicionales. Se sometieron a una ronda adicional de clonación para garantizar la homogeneidad del cultivo y se exploraron usando el ensayo de ELISA directo. Después de un ensayo de valoración más, se seleccionan dos clones de IL-21 finales. Los clones de hibridoma se cultivan en un medio de cultivo de medio de Dulbecco modificado de Iscove al 90% con 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de penicilina, y 100 µg/ml de sulfato de estreptomycin, y suero de clon fetal I al 10% (Hyclone Laboratories). Los clones

se propagan sembrando cultivos en  $2 \times 10^5$  células/ml y manteniéndose entre  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$  células/ml a 37 °C y CO al 5-6%. Las células se adaptan a condiciones sin suero tras transferencias posteriores. Las células se congelan en suero al 90%, DMSO al 10% y se almacenan en una fase de vapor de un congelador de nitrógeno líquido.

- 5 **[0169]** Los anticuerpos monoclonales purificados producidos por los clones de hibridomas se caracterizan de varias maneras, incluyendo preclasificación (es decir, determinando si cada anticuerpo puede inhibir la unión de cualquier otra unión), mapeo de epítotos usando péptidos, afinidad relativa, y neutralización.

10 **Ejemplo 11 - Selección de Secuencias Peptídicas para su Uso en la Evaluación de Anticuerpos Monoclonales Dirigidos contra IL-21 Humano**

- 15 **[0170]** Una evaluación de la unión de anticuerpos IL21 murino anti-humano a los diversos dominios de IL-21 se realizó en parte a través de la capacidad de los anticuerpos monoclonales de unir péptidos sintéticos obtenidos a partir de la secuencia humana nativa IL-21. Se seleccionaron péptidos de 18-29 aminoácidos para proporcionar una cobertura significativa del polipéptido de citocina al mismo tiempo que se centran en los dominios predichos de estudios de la citocina muteína y la estructura de citocinas relacionadas con IL-21 que serán importantes en la unión o la activación del receptor. También son eficaces para la fabricación los péptidos de este intervalo de tamaño y son de un tamaño que puede proporcionar la estructura secundaria limitada para el reconocimiento de anticuerpos. Los péptidos 1, 3 y 4 se sintetizaron con un termino carboxilo amidado para imitar mejora la carga electrostática encontrada en los enlaces peptídicos nativos.

20 Péptido N° 1

- 25 **[0171]** El término N de IL-21 humano siguiendo el procesamiento de un mamífero de la secuencia peptídica señal, junto con la secuencia aminoacídica adyacente de IL-21 (SEQ ID NO: 6) se seleccionó para un péptido. La expresión de mamíferos de la secuencia IL-21 humano y N-terminal de la citocina demostró previamente que tras la escisión del péptido señal, el aminoácido N-terminal resultantes era el derivado de piroglutamato de glutamina-30. Este derivado se seleccionó para el aminoácido N-terminal para el péptido y junto con los 20 aminoácidos posteriores que se encuentran en el término amino de IL-21 humano. Para permitir un acoplamiento eficaz y específico del péptido a proteínas portadoras o una matriz de fase sólida necesaria para el análisis con este péptido, se añadió un resto de cisteína adicional al término carboxilo del péptido. La secuencia peptídica completa es piroGQDRHMIRMRLIDIVDQLKCamida (SEQ ID NO: 1).

35 Péptido N° 2

- 40 **[0172]** El segundo péptido se seleccionó debido a su carácter hidrófilo, la presencia de restos de prolina (segmento predicho no helicoidal), y su ubicación en la secuencia IL-21 entre las regiones de hélice A y B predichas. El extremo terminal carboxi del péptido se seleccionó debido a la presencia de un resto de cisteína en la secuencia polipeptídica IL-21 humana. La secuencia peptídica es NDLVPEFLPAPEDVETNC (SEQ ID NO: 2).

45 Péptido N° 3

- 50 **[0173]** Esta secuencia peptídica se seleccionó por su ubicación predicha que comprende una porción significativa de la hélice C hidrófila de la estructura IL-21. Se predice que esta región tan hidrófila es importante en la interacción ligando-receptor, y el tramo del péptido también se seleccionó para permitir la inclusión de un resto de cisteína nativo (Cys-122) para permitir conjugaciones eficaces cuando sea apropiado, como se ha apreciado anteriormente. La secuencia peptídica es NVSIKCLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCamida (SEQ ID NO: 3).

55 Péptido N° 4

- 60 **[0174]** Este péptido se seleccionó debido a su ubicación cerca del termino carboxilo de la citocina y porque los estudios que utilizan muteínas IL-21 han demostrado que está región peptídica es importante para la activación del ligando-receptor pero no para la unión al ligando. Se ha demostrado que la mutación de Gln-145 y/o Ile-148 contenida en la secuencia de este péptido afecta a la activación del receptor de IL-21 humano. El péptido de 29 aminoácidos se inició en la Cys-125 nativa para permitir su uso en el acoplamiento químico del péptido como se ha apreciado anteriormente, y terminar en Ser-153. Esta serina es el aminoácido final en IL-21 murino, por lo que se predice que el terminal amino de la secuencia peptídica de este resto contiene los elementos de la secuencia IL-21 humana que son importantes para la actividad del ligando. La secuencia peptídica es CDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSamida (SEQ ID NO: 4).

65 **Ejemplo 12 - Ensayo STAT3 fosforilado para la detección de la neutralización de IL-21**

- [0175]** Se usaron transfectantes del receptor de Baf3/IL21 humano (hIL-21R) obtenidos previamente (véanse, las patentes de Estados Unidos 6.307.024 y 6.686.178). Las células se lavaron tres veces en un medio de bioensayo de Baf3 que consiste en: RPMI, 1 x Glutamax, suero fetal bovino al 10%, Beta-mercaptoetanol 50 uM, 200 ug/ml de Zeocina, 1 mg/ml de G418 (todos de Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Después del tercer lavado, las células se

contaron usando procedimientos convencionales (hemacitómetro) y se suspendieron de nuevo en  $6 \times 10^5$  células por ml en un medio de bioensayo. Después, las células se pusieron en una placa de cultivo tisular de fondo redondo con 96 pocillos con 30.000 células por pocillo. Después, la placa se transfirió a una incubadora de cultivo tisular a 37 °C mientras que las otras placas de ensayo se prepararon.

**[0176]** Después, la placa de muestras se preparó con 30 µl de 2,0 ng/ml de IL-21 humano más 30 µl de uno de los siguientes: suero de ratón diluido (concentraciones finales de 1:10, 1:50 ó 1:100), medios, anticuerpo neutralizante anti-IL-21 (diversos extractos y concentraciones), hIL-21R soluble (ejemplo 2) o controles irrelevantes. Después, la placa se transfirió a una incubadora a 37 °C. Después de 30-40 minutos, tanto la placa de células como las placas de muestras se retiraron de la incubadora y se transfirieron 50 µl de cada pocillo en la placa de muestras a la placa de células y se mezclaron. Después, las placas se pusieron de nuevo en la incubadora a 37 °C durante exactamente 8 minutos. En este punto, la reacción se detuvo colocando la placa sobre hielo y añadiendo 150 ul de tampón de lavado celular BioPlex enfriado con hielo (BioRad Laboratories, Hercules, CA). La placa se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm y a 4 °C. Tras la centrifugación, el sobrenadante se desecharon por el lavabo y las células se lisaron en 60 µl de tampón de lisis BioPlex que contenía Factor 1, Factor 2 y PMSF (todos de BioRad). Las células lisadas se pipetearon para eliminar los grupos y después se agitaron a 600 rpm a 4 °C durante 20 minutos. Después, la placa se centrifugó de nuevo durante 20 minutos a 3000 rpm a 4 °C. Después de la centrifugación, se eliminaron 55 ul de lisado y se mezclaron con 55 ul de tampón de ensayo con pruebas de fosfoproteínas (BioRad).

**[0177]** En este punto, una placa de filtro se humedeció previamente con 50 ul de tampón de lavado de fosfoproteínas (PWB), se aspiró y se pusieron en placas 50 ul de lechos acoplados a fosfoSTAT3 (BioRad). Después, estos lechos se aspiraron y la placa se lavó tres veces con 75 ul de PWB. Tras la aspiración final, se transfirieron 50 ul de lisado diluido a la placa, que después se cubrió y se agitó durante una noche a temperatura ambiente. La mañana siguiente, la placa se lavó tres veces con PWB, y después se añadieron anticuerpos de detección fosfoSTAT3 biotinilados (BioRad) durante 20 minutos a temperatura ambiente. La placa se lavó tres veces más en PWB y después se añadió estreptavidina-PE durante 10 minutos. Finalmente, la placa se lavó tres veces con tampón de resuspensión de fosfoproteína (PRB) y los lechos se suspendieron de nuevo en 125 ul de PRB.

**[0178]** Se midió el STAT3 fosforilado total en cada pocillo siguiendo el protocolo de recogida de datos convencional Luminescence 100 como se recomienda por el fabricante (Luminescence Inc., Austin, TX). Después, los datos se analizaron y se expresaron como veces de inducción de STAT3 fosforilado en comparación con el medio solo.

**[0179]** El suero de ratones inmunizados con diversos péptidos de IL-21 (véase la tabla 1) se ensayó para la neutralización de la fosforilación de STAT3 inducida por IL21. IL-21 se mezcló previamente con una dilución en suero durante 30 minutos a 37 °C. Después, esta solución se añadió a los transfectantes Baf3/hIL21R durante 8 minutos. Después, la reacción se detuvo, las células se lisaron y se midió el STAT3 fosforilado. El aumento de veces del STAT3 fosforilado se calcula usando el control de "medio solo" como medida inicial. Números inferiores se correlacionan con una neutralización de IL-21 más fuerte. Los datos se resumen en la Tabla 2 que se muestra a continuación.

**[0180]** En resumen: uno de tres ratones (#1976) inmunizados con el péptido N° 1 y dos de tres ratones (#1979, 1980) inmunizados con el péptido N° 2, generaron anticuerpos neutralizantes IL-21. Ninguno de los ratones inmunizados con los péptidos N° 3 y N° 4 generaron anticuerpos neutralizantes. La neutralización observada en la columna de dilución 1:10 puede deberse a una actividad anti-IL-21 no específica de efecto en suero (referencia a datos "en suero irrelevantes").

Tabla 1

Péptidos IL21 y números de muestras en suero correspondientes	
Muestra N°	Péptido N°
1976-1978	Péptido N° 1 (véase el ejemplo 11)
1979-1981	Péptido N° 2 (véase el ejemplo 11)
1982-1984	Péptido N° 4 (véase el ejemplo 11)
1985-1987	Péptido N° 3 (véase el ejemplo 11)
1988-1990	Péptido N° 3 (véase el ejemplo 11)



Tabla 3

Denominación	Isotipo	Neutralización	Se une a proteína Fc hIL-21	Se une a muteína hIL-21	Se une a proteína mL-21-mFc	Se une al péptido número
Ratón Ab 338.17	IgG1	Sí	Sí	Sí	Sí	Nº 3
Ratón Ab 338.24	IgG1	Sí	Sí	Sí	Sí	Nº 3
Ratón Ab 338.25	IgG1	Sí	Sí	No	Sí	Ninguno
Ratón Ab 338.29	IgG1	Sí	Sí	Sí	Sí	Nº 1
Rata Ab 272.21.1.3.4.2	IgG2a	Sí	No	Sí	Sí	Nº 1

5 **[0183]** Ratón Ab 338.17 Esta muestra se unió a la estructura de proteína humana IL-21 en un área predicha como la región de la Hélice C en base a su capacidad para unirse al Péptido Nº 3.

**[0184]** Ratón Ab 338.24 Esta muestra se unió a la estructura de proteína humana IL-21 en un área predicha como la región de la C-Hélice-C en base a su capacidad para unirse al Péptido Nº 3.

10 **[0185]** Ratón Ab 338.25 Esta muestra se unió al lado Hélice D de la molécula cercana a Q145 y/o I148 (SEQ ID NO: 6) en base a su capacidad para unirse al hIL-21 nativo pero no a la muteína hIL-21. Es probable que la unión sea a un epítipo discontinuo en base a su incapacidad para unirse al Péptido Nº 4, que contiene la secuencia peptídica nativa mutada en la muteína IL-21, o el epítipo puede requerir la presencia de Ser154-Ser162 de la secuencia humana IL-21 (SEQ ID NO: 6).

15 **[0186]** Ratón Ab 338.29 Esta muestra se unió a la estructura de proteína humana IL-21 en un área predicha como la región de la Hélice A en base a su capacidad para unirse al Péptido Nº 1. En base a su capacidad para reaccionar moderadamente con un Péptido Nº 1 conjugado en el terminal C, pero para reaccionar muy fuertemente con el péptido no conjugado, se puede predecir que el epítipo para este anticuerpo incluirá el dominio medio o terminal C de la Hélice A como se representa en el Péptido Nº 1.

20 **[0187]** Rata Ab 272.21.1.3.4.2 En base a su capacidad para reaccionar débilmente tanto con el Péptido Nº 1 conjugado en el terminal C como no conjugado, su capacidad para neutralizar hIL-21, pero su incapacidad para capturar hIL-21-Fc de la solución, este anticuerpo se une a un epítipo discontinuo en gran medida en la estructura de proteína humana IL-21 que comprende un área que se predice que está en la región del terminal N de IL-21 y la Hélice A y requiere especio cerca del terminal C adyacente de hIL-21 donde se une a la proteína de fusión Fc.

#### LISTA DE SECUENCIAS

30 <110> ZymoGenetics, Inc. Sivakumar, Pallavur Jaspers, Stephen R.

<120> IL-21 ANTAGONISTS

35 <130> 05-24PC

<150> US 60/740.154

<151> 2005-11-28

40 <160> 8

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

45 <211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> péptido sintetizado

<220>

<221> VARIANTE  
 <222>  
 <223> Xaa = pyroGlu

5 <220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (21)...(21)  
 <400> 1

10 Xaa Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Leu Lys Cys  
 20

<210> 2  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> péptido sintetizado

20 <400> 2

Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro Glu Asp Val Glu Asn  
 1 5 10 15  
 Thr Asn Cys

25 <210> 3  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> péptido sintetizado

<220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (26)...(26)

35 <400> 3

Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala  
 1 5 10 15  
 Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys  
 20 25

40 <210> 4  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> péptido sintetizado

<220>  
 <221> AMIDACIÓN  
 <222> (29)...(29)

50 <400> 4



ES 2 409 835 T3

				40						45					50		
tat	gtg	aat	gac	ttg	gtc	cct	gaa	ttt	ctg	cca	gct	cca	gaa	gat	gta		247
Tyr	Val	Asn	Asp	Leu	Val	Pro	Glu	Phe	Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	Asp	Val		
			55					60					65				
gag	aca	aac	tgt	gag	tgg	tca	gct	ttt	tcc	tgt	ttt	cag	aag	gcc	caa		295
Glu	Thr	Asn	Cys	Glu	Trp	Ser	Ala	Phe	Ser	Cys	Phe	Gln	Lys	Ala	Gln		
		70					75					80					
cta	aag	tca	gca	aat	aca	gga	aac	aat	gaa	agg	ata	atc	aat	gta	tca		343
Leu	Lys	Ser	Ala	Asn	Thr	Gly	Asn	Asn	Glu	Arg	Ile	Ile	Asn	Val	Ser		
	85					90					95						
att	aaa	aag	ctg	aag	agg	aaa	cca	cct	tcc	aca	aat	gca	ggg	aga	aga		391
Ile	Lys	Lys	Leu	Lys	Arg	Lys	Pro	Pro	Ser	Thr	Asn	Ala	Gly	Arg	Arg		
100					105					110					115		
cag	aaa	cac	aga	cta	aca	tgc	cct	tca	tgt	gat	tct	tat	gag	aaa	aaa		439
Gln	Lys	His	Arg	Leu	Thr	Cys	Pro	Ser	Cys	Asp	Ser	Tyr	Glu	Lys	Lys		
				120					125					130			
cca	ccc	aaa	gaa	ttc	cta	gaa	aga	ttc	aaa	tca	ctt	ctc	caa	aag	atg		487
Pro	Pro	Lys	Glu	Phe	Leu	Glu	Arg	Phe	Lys	Ser	Leu	Leu	Gln	Lys	Met		
			135					140					145				
att	cat	cag	cat	ctg	tcc	tct	aga	aca	cac	gga	agt	gaa	gat	tcc			532
Ile	His	Gln	His	Leu	Ser	Ser	Arg	Thr	His	Gly	Ser	Glu	Asp	Ser			
		150					155					160					
tgaggatcta	acttgcagtt	ggacactatg	ttacatactc	taatatagta	gtgaaagtca												592
tttcttttga	ttccaagtgg	aggagcccta	ttaaattata	taaagaaata													642

- <210> 6
- <211> 162
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 6

ES 2 409 835 T3

```

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

```

<210> 7  
 <211> 3072  
 5 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 10 <222> (54)...(491)  
 <400> 7

ES 2 409 835 T3

gagaaccaga ccaaggccct gtcacagct cctggagact cagttctggt ggc atg 56  
Met  
1

gag agg acc ctt gtc tgt ctg gta gtc atc ttc ttg ggg aca gtg gcc 104  
Glu Arg Thr Leu Val Cys Leu Val Val Ile Phe Leu Gly Thr Val Ala  
5 10 15

cat aaa tca agc ccc caa ggg cca gat cgc ctc ctg att aga ctt cgt 152  
His Lys Ser Ser Pro Gln Gly Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu Arg  
20 25 30

cac ctt att gac att gtt gaa cag ctg aaa atc tat gaa aat gac ttg 200  
His Leu Ile Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp Leu  
35 40 45

gat cct gaa ctt cta tca gct cca caa gat gta aag ggg cac tgt gag 248  
Asp Pro Glu Leu Leu Ser Ala Pro Gln Asp Val Lys Gly His Cys Glu  
50 55 60 65

cat gca gct ttt gcc tgt ttt cag aag gcc aaa ctc aag cca tca aac 296  
His Ala Ala Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser Asn  
70 75 80

cct gga aac aat aag aca ttc atc att gac ctc gtg gcc cag ctc agg 344  
Pro Gly Asn Asn Lys Thr Phe Ile Ile Asp Leu Val Ala Gln Leu Arg  
85 90 95

agg agg ctg cct gcc agg agg gga gga aag aaa cag aag cac ata gct 392  
Arg Arg Leu Pro Ala Arg Arg Gly Gly Lys Lys Gln Lys His Ile Ala  
100 105 110

aaa tgc cct tcc tgt gat tcg tat gag aaa agg aca ccc aaa gaa ttc 440  
Lys Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Arg Thr Pro Lys Glu Phe  
115 120 125

cta gaa aga cta aaa tgg ctc ctt caa aag atg att cat cag cat ctc 488  
Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu  
130 135 140 145

tcc tagaacacat aggaccgaa gattcctgag gatccgagaa gattcccag 541  
Ser

gactgaggag acgccggaca ctatagacgc tcacgaatgc aggagtacat cttgcctctt 601  
gggattgcaa gtggagaagt acgatacgtt atgataagaa caactcagaa aagctatagg 661  
ttaagatcct ttcgccatt aactaagcag acattgtggt tcctgcaca gactccatgc 721

ES 2 409 835 T3

```

tgtcaacatg gaaaatctca actcaacaag agcccagctt cccgtgtcag ggatttctgg 781
tgcttctcaa gctgtggctt catcttattg cccaactgtg acattccttg attggaaggg 841
gaaaactaaa gcttttagca aaaatacagc tagggaattt gtcgatctgc gagagtaaga 901
cctcttatga tcctaacgga atgatgtaag ctggaaataa taagcataag atgaaattga 961
aaattgaagt ctttattctt taagaaaaac tttgtacttg aaagcatgtc tgaagagttt 1021
actcattacc acaaacatct agcatattga taactaacat ctttatactc tacaagagag 1081
gctttccaga taggtacagt ttttcttctc tattaggtct atcaaaattt aacctattat 1141
gagggtcacc cctggctttc actgtttttc taaagaggca aggggtgtagt aagaagcagg 1201
cttaagttgc cttcctccca atgtcaagtt cctttataag ctaatagttt aatcttgtga 1261
agatggcaat gaaagcctgt ggaagtgcaa acotcactat cttctggagc caagtagaat 1321
tttcaagttt gtagctctca cctcaagtgg ttatgggtgt cctgtgatga atctgtctagc 1381
tccagcctca gtctcctctc ccacatcctt tcctttcttt cctctttgaa acttctaaga 1441
aaaagcaatc caaacaagtt cagcacttaa gacacattge atgcacactt ttgataagtt 1501
aaatccaacc atctatttaa aatcaaaatc aggagatgag ccaagagacc agaggttctg 1561
ttccagtttt aaacagactt ttactgaaca tcccaatctt ttaaccacag aggctaaatt 1621
gagcaaatag ttttgccatt tgatataatt tccaacagta tgtttcaatg tcaagttaa 1681
aagtctacaa agctattttc cctggagtgg tatcatcgct ttgagaattt cttatgggta 1741
aaatggatct gagatccaag catggcctgg gggatggttt tgatctaagg aaaaagggtg 1801
ctgtacctca cagtgccttt aaaacaagca gagatcccgt gtaccgcctt aagatagcac 1861
agactagtgt taactgattc ccagaaaagt gtcacaatca gaaccaacgc attctcttaa 1921
actttaaaaa tatgtattgc aaagaacttg tgtaactgta aatgtgtgac tgttgatgac 1981
attatacaca catagcccac gtaagtgtcc aatggtgcta gcattgggtg ctgagtttgc 2041
tgctcgaag ctgaagcaga gatgcagtcc ttcacaaagc aatgatggac agagagggga 2101
tgctccatgt tttattcttt tgttgtttct ggctgtgtaa ctggtgactt cttgacattg 2161
tgtttttat atttaagaca atgtatttat tttggtgtgt ttattgttct agccttttaa 2221
atcactgaca atttctaate aagaagtaca aataattcaa tgcagcacag gctaagagct 2281
tgtatcgttt ggaaaagcca gtgaaggctt ctccactagc catgggaaag ctacgcttta 2341
gagtaaacta gacaaaattg cacagcagtc ttgaacctct ctgtgctcaa gactcagcca 2401
gtcctttgac attattgttc actgtgggtg ggaacacatt ggacctgaca cactgtttgt 2461
tgtccatgaa ggttgccact ggtgtaagct ttttttggtt ttcattctct tatctgtaga 2521
acaagaatgt ggggctttcc taagtctatt ctgtatttta ttctgaactt cgtatgtctg 2581
agttttaatg ttttgagtac tcttacagga acacctgacc acacttttga gttaaatttt 2641
atccaagtg tgatatttag ttgttcaaaa agggaaggga tatacatata tacatata 2701
catacatata tatatatata tatatatata tatatatata tatatatata 2761
tatatataga gagagagaga gagagagaga gagaaagaga gagaggttgt ttaggtcat 2821
aggagttcag aggaaatcag ttatggccgt taatactgta gctgaaagtg ttttctttgt 2881
gaataaattc atagcattat tgatctatgt tattgctctg ttttatttac agtcacacct 2941
gagaatttag ttttaatatg aatgatgtac tttataactt aatgattatt tattatgtat 3001
ttggttttga atgtttgtgt tcatggcttc ttatttaaga cctgatcata ttaaagtcta 3061
cccagtcagg a
3072

```

<210> 8

<211> 146

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 8



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo que es capaz de competir con un anticuerpo monoclonal 272.21.1.13.4.2 (ATCC con N° de Acceso PTA-10395) para unir un antígeno IL-21 humano, en el que el anticuerpo se une específicamente a hIL-21 con una afinidad de unión de  $10^7 \text{ M}^{-1}$  o mayor, y en el que el anticuerpo neutraliza el IL-21 humano.
2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal 272.21.1.13.4.2 (ATCC con N° de Acceso PTA-10395), con una afinidad de unión de  $10^7 \text{ M}^{-1}$  o mayor.
- 10 3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el anticuerpo está etiquetado con un marcador detectable, preferiblemente en el que el marcador detectable se selecciona entre el grupo que consiste en un isótopo radiactivo, una enzima, un colorante y biotina.
- 15 4. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la afinidad de unión es  $10^9 \text{ M}^{-1}$  o mayor.
5. Una célula de hibridoma que produce un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2.
- 20 6. Un procedimiento de producción del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende:
  - (a) proporcionar un hibridoma capaz de producir el anticuerpo; y
  - (b) cultivar el hibridoma en condiciones que proporcionen la producción del anticuerpo por el hibridoma.
- 25 7. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 8. Un anticuerpo anti-IL-21 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune.
- 35 9. Un anticuerpo anti-IL-21 o una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la enfermedad autoinmune se selecciona entre el grupo que consiste en pancreatitis, diabetes de tipo I (IDDM), enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diverticulosis, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, espondilitis anquilosante, escleroderma, esclerosis sistémica, artritis psoriásica, osteoartritis, dermatitis atópica, vitíligo, enfermedad de injerto contra huésped (EICH), linfoma cutáneo de linfocitos T (LCLT), síndrome de Sjogren, glomerulonefritis, nefropatía por IgA, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo al trasplante, dermatitis atópica, síndrome antifosfolípido y asma, y otras enfermedades autoinmunes.
- 40 10. Uso de un anticuerpo anti-IL-21 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune.