

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 491 118**

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 12192046 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2567973**

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:

05.09.2014

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:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 491 118 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 El sistema inmunitario es la defensa primaria del organismo frente a enfermedades causadas por patógenos, a saber, bacterias, virus, hongos, etc., así como frente a enfermedades causadas por un crecimiento anormal de las propias células y tejidos del cuerpo (es decir, tumores cancerosos). Normalmente, el sistema inmunitario es capaz de distinguir entre las células normales del cuerpo o "propias" y patógenos o células anormales extrañas o "no propias". El proceso mediante el cual el sistema inmunitario se abstiene de reaccionar contra el propio organismo se denomina tolerancia. A veces, el sistema inmunitario pierde la capacidad de reconocerse "a sí mismo" como normal y la respuesta subsiguiente dirigida contra los tejidos o las células da como resultado una pérdida de tolerancia, un estado de autoinmunidad. Las patologías resultantes de la autoinmunidad tienen con frecuencia serias consecuencias clínicas y son uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, especialmente en naciones desarrolladas.
- 10
- 15 Las citoquinas generalmente estimulan la proliferación o la diferenciación de las células del linaje hematopoyético o participan en los mecanismos de respuesta inmune e inflamatoria del organismo. Las interleuquinas son una familia de citoquinas que median en las respuestas inmunológicas. Los receptores que se unen a las citoquinas están normalmente compuestos por una o más proteínas integrales de membrana que se unen a la citoquina con gran afinidad y transducen este fenómeno de unión a la célula a través de las porciones citoplásmicas de ciertas subunidades de los receptores. Los receptores de citoquinas han sido agrupados en varias clases basándose en similitudes en sus dominios de unión a ligando extracelulares. Por ejemplo, las cadenas de receptores responsables de la unión a, y/o de la transducción del efecto de, los interferones son miembros de la clase II de la familia de los receptores de citoquinas, basándose en un dominio extracelular característico de 200 residuos.
- 20
- 25 La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-IL-21 y métodos de utilización de esos anticuerpos que inhiben los síntomas y las actividades biológicas que se manifiestan como trastornos autoinmunes e inflamatorios y que se asocian a la interacción IL-21/receptor de IL-21.
- 30 WO 99/61617 describe secuencias de polipéptidos y polinucleótidos de interleuquinas.
- WO 03/040313 describe antagonistas de IL-21. WO 2004/083249 describe anticuerpos contra el receptor de IL-21 humano. WO 2004/055168 describe la producción de IL-21 en huéspedes procarióticos. WO 2006/057027 describe epitopos antigénicos de interleuquina-21, anticuerpos relacionados y su uso en ámbitos médicos.
- 35
- Nutt y col., *Critical Reviews in Immunology*, Vol. 24(4), 2004, páginas 239-250, describe la IL-21: una pieza clave en la maduración de los linfocitos.
- 40 Jin Haoli y col., *J. Immunology*, Vol. 173(1), 1 de julio de 2004, páginas 657-665, informa de que distintas señales de activación determinan si la IL-21 induce coestimulación de las células B, detención del crecimiento o apoptosis dependiente de bim.
- Ueda Maki y col., *British J. of Haematology*, Enero de 2005, Vol. 128(2), páginas 169-176, describe la expresión del receptor de IL-21 funcional en células de leucemia de células T del adulto.
- 45
- Caruso y col., *Gastroenterology*, Vol. 132(1), 20 de enero de 2007, páginas 166-175, describe un papel funcional para IL-21 en la promoción de la síntesis del factor quimiotáctico de células T, MIP-3alfa, por las células epiteliales del intestino.
- 50 La presente memoria descriptiva describe un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 que se une a una región antigénica de la IL-21 humana. Un anticuerpo monoclonal puede unirse a una región antigénica de IL-21 que se muestra en el N° ID. SEC.: 6 correspondiente a los residuos de aminoácidos 97-122. Un anticuerpo monoclonal puede unirse a una región antigénica como se muestra en el N° ID. SEC.: 6 correspondiente a los residuos de aminoácidos 145 a 148. Un anticuerpo monoclonal puede unirse a una región antigénica como se muestra en el N° ID. SEC.: 6 correspondiente a los residuos de aminoácidos 154 a 162.
- 55
- En una realización, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une a una región antigénica como se muestra en el N° ID. SEC.: 6 correspondiente a los residuos de aminoácidos 30 a 50. En otra realización, el anticuerpo monoclonal se une a una región antigénica como se muestra en el N° ID. SEC.: 6 correspondiente a los residuos de aminoácidos 40 a 50. Realizaciones adicionales incluyen anticuerpos monoclonales como se describe en el presente documento que se puede ver que neutralizan la actividad de una proteína IL-21 humana, que se unen a una IL-21 humana-proteína Fc, que se unen a una muteína humana-proteína Fc, donde las mutaciones están en Gln 145 y/o Ile148 del N° ID. SEC.: 6, o que se unen a una proteína de fusión IL-21 de ratón-Fc de ratón. En general, los anticuerpos monoclonales de la presente invención se unen a dos o más proteínas IL-21.
- 60
- 65

En otros aspectos, el anticuerpo monoclonal se une específicamente al epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal 272.21.1.13.4.2 (Nº de Acceso ATCC PTA-10395). En otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal se une específicamente al epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal 268.5.1.11.42.1.4.3.9 (Nº de Acceso ATCC PTA-10394). Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden ser también marcados con un marcador detectable, y el marcador detectable puede ser seleccionado entre, aunque sin limitación, isótopos radiactivos, enzimas, tintes y biotinas.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un bin (o grupo de anticuerpos) que es capaz de competir con el anticuerpo monoclonal 272.21.1.13.4.2 (Nº de Acceso ATCC PTA-10395) por la unión a un antígeno IL-21 humano.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un bin que es capaz de competir con el anticuerpo monoclonal 268.5.1.11.42.1.4.3.9 (Nº de Acceso ATCC PTA-10394) por la unión a un antígeno IL-21 humano.

También se incluyen en la presente invención hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales reivindicados.

La presente invención proporciona un método de producción de los anticuerpos monoclonales reivindicados, consistente en: (a) proporcionar un hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal y (b) cultivar el hibridoma en condiciones que permitan la producción del anticuerpo monoclonal por el hibridoma.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de tratamiento de una enfermedad autoinmune, consistente en administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 reivindicados a un paciente. En ciertas realizaciones, la enfermedad autoinmune es seleccionada entre el grupo consistente en pancreatitis, diabetes de tipo I (DMID), Enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), Enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino irritable, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diverticulosis, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, espondilitis anquilosante, esclerodermia, esclerosis sistémica, artritis psoriásica, osteoartritis, dermatitis atópica, vitiligo, enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), linfoma cutáneo de células T (LCCT), síndrome de Sjogren, glomerulonefritis, nefropatía por IgA, enfermedad del injerto contra el huésped, rechazo de trasplantes, dermatitis atópica, síndrome antifosfolípido y asma, y otras enfermedades autoinmunes.

La presente invención también proporciona un método de inhibición o reducción de un trastorno mediado por IL-21, consistente en 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.

Descripción de la invención

Se proporcionan las siguientes definiciones para facilitar la comprensión de las invenciones descritas en el presente documento.

El término "anticuerpo" o "péptido(s) de anticuerpo" se refiere a un anticuerpo intacto, o un fragmento de unión del mismo, que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica, e incluye anticuerpos quiméricos, humanizados, totalmente humanos y biespecíficos. En ciertas realizaciones, se producen fragmentos de unión por técnicas de ADN recombinante. En realizaciones adicionales, se producen fragmentos de unión por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Como fragmentos de unión se incluyen, aunque sin limitación, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y anticuerpos de una sola cadena.

El término "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes de su ambiente natural contaminantes son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, se purificará el anticuerpo (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo, según se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente hasta más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de 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 del anticuerpo no estará presente. De manera ordinaria, sin embargo, se preparará el anticuerpo aislado mediante al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo anti-IL-21 "variante" se refiere en el presente documento a una molécula que difiere en secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-IL-21 "parental" en virtud de adición, delección y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia del anticuerpo parental. En la realización preferida, la variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más regiones hipervariables del anticuerpo parental. Por ejemplo, la variante puede comprender al menos una, *v.g.*, de aproximadamente una a aproximadamente diez, y preferentemente de aproximadamente dos a aproximadamente cinco, sustituciones en una o más regiones hipervariables del anticuerpo parental. De manera ordinaria, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos con al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a las secuencias de

dominios variables de las cadenas pesadas o ligeras del anticuerpo parental, más preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 % y más preferentemente al menos un 95 %. Se define la identidad u homología con respecto a esta secuencia en el presente documento como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos del anticuerpo parental, después de alinear las secuencias y de introducir huecos, de ser necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. No se ha de considerar que ninguna de las extensiones, deleciones o inserciones N-terminales, C-terminales o internas en la secuencia del anticuerpo afecte a la identidad u homología de secuencia. La variante conserva la capacidad de unirse a la IL-21 humana y preferentemente tiene propiedades que son superiores a las del anticuerpo parental. Por ejemplo, la variante puede tener una afinidad de unión más potente y una mayor capacidad para inhibir la estimulación inducida por IL-21 de las células inmunes. Para analizar dichas propiedades, habría que comparar una forma Fab de la variante con una forma Fab del anticuerpo parental o una forma de longitud total de la variante con una forma de longitud total del anticuerpo parental, por ejemplo, ya que se ha visto que el formato del anticuerpo anti-IL-21 impacta en su actividad en los ensayos de actividad biológica divulgados en el presente documento. El anticuerpo variante de particular interés en el presente documento es uno que exhiba un aumento al menos aproximadamente 10 veces mayor, preferentemente al menos aproximadamente 20 veces mayor y más preferentemente al menos aproximadamente 50 veces mayor, en la actividad biológica en comparación con el anticuerpo parental.

El término "anticuerpo parental", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que está codificado por una secuencia de aminoácidos usada para la preparación de la variante. Preferiblemente, el anticuerpo parental tiene una región de marco humana y, si está presente, tiene región(es) constante(s) de anticuerpo humana(s). Por ejemplo, el anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humanizado o humano.

El término "agonista" se refiere a cualquier compuesto, incluyendo una proteína, un polipéptido, un péptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula de gran tamaño o una molécula de pequeño tamaño (menos de 10 kD), que aumente la actividad, la activación o la función de otra molécula. Los agonistas de IL-21 causan, por ejemplo: estimulación de las células NK, de subgrupos de células T y subgrupos de células B y de las células dendríticas.

El término "antagonista" se refiere a cualquier compuesto, incluyendo una proteína, un polipéptido, un péptido, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una molécula de gran tamaño o una molécula de pequeño tamaño (menos de 10 kD), que disminuya la actividad, la activación o la función de otra molécula. Los antagonistas de IL-21 causan: disminución en la función inmune de las células NK, de subgrupos de células T y subgrupos de células B y de las células dendríticas, y se unen a IL-21 de tal forma que la interacción de la proteína IL-21 resulta bloqueada, inhibida, reducida, antagonizada o neutralizada.

Se entiende que un "anticuerpo bivalente" distinto de un anticuerpo "multiespecífico" o "multifuncional", en ciertas realizaciones, comprende sitios de unión que tienen una especificidad antigénica idéntica.

Un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido que tiene dos pares diferentes de cadenas pesadas/ligeras y dos sitios de unión diferentes. Se pueden producir anticuerpos biespecíficos por varios métodos, incluyendo, aunque sin limitación, la fusión de hibridomas o la unión de fragmentos Fab'. Véanse, *v.g.*, Songvilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990); Kostelny y col., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992).

El término "anticuerpo quimérico" o "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos cuyos genes de cadenas ligeras y pesadas han sido construidos, normalmente por ingeniería genética, a partir de genes de regiones variables y constantes de inmunoglobulinas pertenecientes a diferentes especies. Por ejemplo, se pueden unir los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón a segmentos constantes humanos, tales como gamma 1 y gamma 3. Un anticuerpo quimérico terapéutico típico es, por lo tanto, una proteína híbrida compuesta por el dominio variable o de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio constante de un anticuerpo humano, aunque se pueden usar otras especies de mamíferos.

El término "título neutralizante efectivo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de anticuerpo que corresponde a la cantidad presente en el suero de animales (humano o de la rata alodónera) que ha mostrado o bien ser clínicamente eficaz (en humanos), o bien reducir el virus en un 99 % en, por ejemplo, las ratas alodóneras. Se define la reducción del 99 % por un desafío específico de, *v.g.*, 10^3 ufp, 10^4 ufp, 10^5 ufp, 10^6 ufp, 10^7 ufp, 10^8 ufp o 10^9 ufp de VSR.

El término "epitopo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o un receptor de células T. Los determinantes epitópicos consisten normalmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Más concretamente, el término "epitopo IL-21", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una porción de un polipéptido IL-21 que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferentemente en un mamífero y más preferentemente en un ratón o un humano. Un epitopo que tiene actividad inmunogénica es una porción de un polipéptido IL-21 que provoca una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epitopo que tiene actividad antigénica

es una porción de un polipéptido IL-21 a la que se une un anticuerpo inmunoespecíficamente, según se determina por cualquier método bien conocido en la técnica, por ejemplo, por inmunoensayos. Los epitopos antigénicos no tienen por qué ser necesariamente inmunogénicos.

5 El término "marcado con epitopo", cuando se usa en el presente documento, se refiere al anticuerpo anti-IL-21 fusionado a un "marcador epitópico". El polipéptido marcador epitópico tiene suficientes residuos como para proporcionar un epitopo contra el cual se puede producir un anticuerpo, pero aun así es lo suficientemente corto como para no interferir con la actividad del anticuerpo IL-21. El marcador epitópico preferentemente es lo
10 suficientemente único como para que el anticuerpo no reaccione substancialmente de manera cruzada con otros epitopos. Los polipéptidos marcadores adecuados generalmente tienen al menos 6 residuos de aminoácidos y normalmente aproximadamente 8-50 residuos de aminoácidos (preferentemente aproximadamente 9-30 residuos). Como ejemplos, se incluyen el polipéptido marcador flu HA y su anticuerpo 12CA5 (Field y col., Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165 (1988)); el marcador c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para el mismo (Evan y col., Mol. Cell. Biol. 5(12): 3610-3616 (1985)); y el marcador de la glicoproteína D (gD) del virus *Herpes simplex* y su
15 anticuerpo (Paborsky y col., Protein Engineering 3(6): 547-553 (1990)). En ciertas realizaciones, el marcador epitópico es un "epitopo de unión a receptores salvajes". Tal como se usa en el presente documento, el término "epitopo de unión a receptores salvajes" se refiere a un epitopo de la región Fc de una molécula de IgG (v.g., IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable del aumento de la vida media sérica *in vivo* de la molécula de IgG.

20 El término "fragmento", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 40 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 50 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 60 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 70
25 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 80 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 90 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 100 residuos de aminoácidos contiguos, al menos 125 residuos de aminoácidos contiguos o al menos 150 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido IL-21 o un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un polipéptido IL-21.

30 Tal como se utiliza aquí, el término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína consistente en uno o más polipéptidos substancialmente codificados por genes de inmunoglobulinas. 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 ligera y una pesada. En cada par, las regiones variables de las cadenas ligera y pesada son conjuntamente responsables de la unión a un antígeno, y las regiones
35 constantes son responsables de las funciones efectoras del anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulinas de longitud total (aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos) están codificadas por un gen de región variable en el extremo NH₂ (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de región constante kappa o lambda en el extremo COOH. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulinas de longitud
40 total (aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos) son codificadas de manera similar por un gen de región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de región constante antes mencionados (aproximadamente 330 aminoácidos). Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. En las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes se unen mediante una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos,
45 incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. (Véase, en general, Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2^a ed. Raven Press, N.Y., 1989), Cap. 7.

Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina consiste en una región de "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables. Así, el término "región hipervariable" se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una "Región Determinante de Complementariedad" o "CDR" (es decir, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada (Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o los residuos de un "bucle hipervariable" (es decir, los
55 residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917, 1987) (ambos incorporados en el presente documento a modo de referencia). Los residuos de la "Región de Marco" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable que son distintos de los residuos de la región hipervariable definidos en el presente documento. Las secuencias de las regiones de marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están
60 relativamente conservados dentro de una especie. Así, una "región de marco humana" es una región de marco que es substancialmente idéntica (en aproximadamente un 85 % o más, normalmente en un 90-95 % o más) a la región de marco de una inmunoglobulina humana natural. La región de marco de un anticuerpo, es decir, las regiones de marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR. Las CDR son primariamente responsables de la unión a un epitopo de un antígeno.

65 En consecuencia, el término inmunoglobulina "humanizada" se refiere a una inmunoglobulina que comprende una

región de marco humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (normalmente de un ratón o de una rata). La inmunoglobulina no humana que aporta las CDR se denomina la "donadora" y la inmunoglobulina humana que aporta el marco se denomina la "aceptora". No es necesario que estén presentes regiones constantes, pero, si lo están, deben ser substancialmente idénticas a las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, es decir, idénticas en al menos aproximadamente un 85-90 %, preferentemente en aproximadamente un 95 % o más. Por ello, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, a excepción posiblemente las CDR, son substancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de la inmunoglobulina humana natural. Un "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina de cadena ligera humanizada y de cadena pesada humanizada. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado no incluiría un anticuerpo quimérico típico como se ha definido anteriormente, *v.g.*, porque la totalidad de la región variable de un anticuerpo quimérico es no humana.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo humano" incluye un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana, e incluye anticuerpos aislados de librerías de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que no expresan inmunoglobulinas endógenas, como describen, por ejemplo, Kucherlapati y col. en la Patente EE.UU. N° 5.939.598.

El término "anticuerpos genéticamente alterados" significa anticuerpos en los que la secuencia de aminoácidos ha sido variada con respecto a la de un anticuerpo nativo. Debido a la relevancia de las técnicas de ADN recombinante en la generación de anticuerpos, no hay necesidad de limitarse a las secuencias de aminoácidos que se encuentran en los anticuerpos naturales; se pueden rediseñar los anticuerpos para obtener características deseadas. Las variaciones posibles son muchas y varían desde el cambio de sólo uno o de unos cuantos aminoácidos hasta el rediseño completo de, por ejemplo, la región variable o constante. Se harán cambios en la región constante, en general, con objeto de mejorar o de alterar características, tales como la fijación del complemento, la interacción con membranas y otras funciones efectoras. Se harán cambios en la región variable con objeto de mejorar las características de unión a antígeno.

Además de como anticuerpos, las inmunoglobulinas pueden existir en otras diversas formas, incluyendo, por ejemplo, una sola cadena o Fv, Fab y (Fab')₂, así como diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos híbridos multivalentes o multispecíficos (como se ha descrito antes y como se describe con detalle en: Lanzavecchia y col., Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987)) y en cadenas únicas (*v.g.*, Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 5879-5883 (1988), y Bird y col., Science, 242: 423-426 (1988), que se incorporan en el presente documento a modo de referencia). (Véanse, en general, Hood y col., "Immunology", Benjamin, N.Y., 2ª ed. (1984), y Hunkapiller y Hood, Nature, 323: 15-16 (1986), que se incorporan en el presente documento a modo de referencia).

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "Fv de una sola cadena", "anticuerpos de una sola cadena", "Fv" o "scFv" se refieren a fragmentos de anticuerpos que comprenden las regiones variables de las cadenas tanto pesadas como ligeras, pero que carecen de las regiones constantes, aunque en una sola cadena polipeptídica. En general, un anticuerpo de una sola cadena comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que le permite formar la estructura deseada que permitiría la unión a antígeno. Pluckthun discute anticuerpos de una sola cadena con detalle en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); véanse también la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO 88/01649 y las Patentes EE.UU. N° 4.946.778 y 5.260.203, cuyas divulgaciones son incorporadas como referencia con cualquier fin. En realizaciones específicas, los anticuerpos de una sola cadena pueden ser también biespecíficos y/o humanizados.

Un "fragmento Fab" está compuesto por una cadena ligera y las regiones C_{H1} y variables de una cadena pesada. La cadena pesada de una molécula Fab no puede formar un enlace disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

Un "fragmento Fab" contiene una cadena ligera y una cadena pesada que contiene más de la región constante, entre los dominios C_{H1} y C_{H2}, de tal modo que puede formarse un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas para formar una molécula F(ab')₂.

Un "fragmento F(ab')₂" contiene dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que contienen una porción de la región constante entre los dominios C_{H1} y C_{H2}, de tal modo que se forma un enlace disulfuro intercatenario entre dos cadenas pesadas.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Utilizando un conector que sea demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y a crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen diacuerpos con más detalle en, por ejemplo, EP 404.097, WO 93/11161 y Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993).

El término "anticuerpos lineales" se refiere a los anticuerpos descritos en Zapata y col., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995). Resumiendo, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem ($V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$) que forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

El término "fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un fragmento de polipéptido que contiene al menos los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina. Un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la invención es capaz de unirse a un ligando, de evitar la unión del ligando a su receptor, de interrumpir la respuesta biológica resultante de la unión del ligando al receptor o de cualquier combinación de éstos. Preferiblemente, un fragmento de inmunoglobulina inmunológicamente funcional de la invención se une específicamente a IL-21.

El término "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, no se limita a anticuerpos producidos por tecnología de hibridomas. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un solo clon, incluyendo cualquier clon eucariótico, procariótico o de fago, y no al método por el cual se produce.

La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a proteínas y polipéptidos IL-21. Se divulgan polipéptidos y proteínas IL-21 humanos y murinos y polinucleótidos que codifican los polipéptidos en Parrish-Novak y col., Nature 408: 57-63, 2003, en las Patentes EE.UU. N° 6.307.024 y 6.686.178 y en WO 04/055168. Como anticuerpos ejemplares, se incluyen anticuerpos neutralizantes, y pueden ser anticuerpos monoclonales murinos, anticuerpos humanizados derivados de anticuerpos monoclonales murinos y anticuerpos monoclonales humanos. Como fragmentos de anticuerpos ilustrativos, se incluyen $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab', Fab, Fv, scFv y unidades de reconocimiento mínimas. Los anticuerpos neutralizantes preferentemente se unen a IL-21, de tal forma que la interacción de la proteína IL-21 se bloquea, inhibe, reduce, antagoniza o neutraliza. Se describen en el presente documento epitopos y características estructurales y funcionales que definen regiones de la proteína IL-21 humana que han sido identificadas como dianas para un anticuerpo monoclonal terapéutico. Se presentan anticuerpos monoclonales de ratón anti-IL-21 humana y anticuerpos monoclonales de rata anti-humanos ejemplares y pools de esos anticuerpos monoclonales con la capacidad de unirse a la IL-21 humana de tipo salvaje, a una proteína IL-21 mutante y/o a regiones peptídicas de la IL-21 humana. La presente invención incluye además composiciones que comprenden un vehículo y un péptido, polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento.

Así, la presente invención proporciona antagonistas de la actividad IL-21, tales como anticuerpos anti-IL-21, que son útiles en el tratamiento terapéutico de enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-21 son útiles en el tratamiento de la pancreatitis, de la diabetes de tipo I (DMID), de la Enfermedad de Graves, de la enfermedad inflamatoria del intestino (EII), de la Enfermedad de Crohn, de la colitis ulcerativa, del síndrome del intestino irritable, de la esclerosis múltiple, de la artritis reumatoide, de la diverticulosis, del lupus eritematoso sistémico, de la psoriasis, de la espondilitis anquilosante, de la esclerodermia, de la esclerosis sistémica, de la artritis psoriásica, de la osteoartritis, de la dermatitis atópica, del vitiligo, de la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), del linfoma cutáneo de células T (LCCT), del síndrome de Sjogren, de la glomerulonefritis, de la nefropatía por IgA, de la enfermedad del injerto contra el huésped, del rechazo de trasplantes, de la dermatitis atópica, del síndrome antifosfolípido y del asma, y de otras enfermedades autoinmunes u otras enfermedades mediadas por IL-21 y agonistas de los receptores de IL-21.

La presente invención también incluye anticuerpos genéticamente alterados que son funcionalmente equivalentes a los anticuerpos antes descritos. Se prefieren anticuerpos modificados que proporcionen una mejor estabilidad y/o eficacia terapéutica. Como ejemplos de anticuerpos modificados, se incluyen los que tienen sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos y una o más deleciones o adiciones de aminoácidos que no alteren significativamente de un modo deletéreo la utilidad de unión a antígeno. Las sustituciones pueden variar desde un cambio o modificación de uno o más residuos de aminoácidos hasta un rediseño completo de una región, siempre que se mantenga la utilidad terapéutica. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser modificados después de la traducción (*v.g.*, acetilación y fosforilación) o pueden ser modificados sintéticamente (*v.g.*, unión de un grupo marcador).

Los anticuerpos genéticamente alterados también incluyen anticuerpos quiméricos derivados de los anticuerpos anti-IL-21. Preferiblemente, los anticuerpos quiméricos comprenden una región variable derivada de un ratón o de una rata y una región constante derivada de un humano, de tal forma que el anticuerpo quimérico tiene una vida media más prolongada y es menos inmunogénico cuando se administra a un sujeto humano. El método de producción de anticuerpos quiméricos es conocido 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.

Preferiblemente, los anticuerpos anti-IL-21 genéticamente alterados usados en la presente invención incluyen la versión humanizada de los anticuerpos descritos en el presente documento. En ciertas realizaciones, el anticuerpo humanizado comprende CDR de una inmunoglobulina donante de ratón y marcos de cadena pesada y de cadena ligera de una inmunoglobulina aceptora humana. El método de producción de anticuerpos humanizados es divulgado en las Patentes EE.UU. N° 5.301.101, 5.585.089, 5.693.762 y 6.180.370 (cada una de las cuales es

incorporada como referencia en su totalidad). Las CDR de estos anticuerpos pueden ser entonces injertadas en cualquier marco humano seleccionado conocido en la técnica para generar el anticuerpo humanizado deseado.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser descritos o especificados en términos del/de los epitopo(s) o de la(s) porción(es) de un polipéptido de la presente invención a los que reconocen o a los que se unen específicamente. El/los epitopo(s) o la(s) porción(es) de polipéptido pueden ser especificados como se describe en el presente documento, *v.g.*, por las posiciones N-terminales y C-terminales, o por el tamaño en residuos de aminoácidos contiguos. Los anticuerpos de la presente invención pueden también ser descritos o especificados en términos de su reactividad cruzada. Se incluyen anticuerpos que no se unen a cualquier otro análogo, ortólogo u homólogo de un polipéptido de la presente invención.

El "binning" epitópico se refiere al uso de ensayos de unión competitiva para identificar pares de anticuerpos que son o no capaces de unirse a la proteína IL-21 simultáneamente, identificándose así anticuerpos que se unen a los mismos epitopos, o a epitopos solapantes, sobre la proteína. Se pueden usar entonces familias de anticuerpos (o "bins") que tienen la misma especificidad de unión para definir epitopos específicos sobre la IL-21. Los experimentos de binning epitópico proporcionan evidencia de que hay presencia de epitopos antigénicamente distintos. Sin embargo, por sí mismos no identifican, o "mapean" el epitopo en una secuencia de aminoácidos o localización específica sobre la molécula de la proteína IL-21.

Se puede evaluar la competición por la unión para cualquier par de anticuerpos o fragmentos. Por ejemplo, utilizando los reactivos de detección apropiados, se puede comparar la especificidad de unión de anticuerpos o fragmentos de unión de cualquier especie/fuente con la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales divulgados en el presente documento. Se puede realizar el binning epitópico con "anticuerpos aislados" o con sobrenadantes de cultivos celulares. Frecuentemente, se realiza el binning con sobrenadantes clonales de primera ronda para guiar la elección de los clones que se seguirán desarrollando. Los anticuerpos que deberán ser comparados deben tener dominios de unión a antígeno substancialmente homogéneos. En el caso de anticuerpos "bienespecíficos" o "bifuncionales", la especificidad de unión de los dos diferentes sitios de unión necesita ser evaluada o "binned" independientemente.

La presente invención incluye tanto anticuerpos específicos de receptor como anticuerpos específicos de ligando. Además de para la unión competitiva de anticuerpos, el binning epitópico puede ser también utilizado para identificar anticuerpos para un receptor o para un ligando que interfieren competitivamente con el binning de un ligando y su receptor. Con frecuencia, se pueden correlacionar las propiedades favorables de una familia (o bin) de anticuerpos con una unión a un epitopo específico definido por el bin epitópico.

Los experimentos de unión competitiva no miden directamente la afinidad de unión; sin embargo, los anticuerpos que han de ser estudiados deben unirse con suficiente potencia para actuar como competidores. En general, se diseñan las condiciones experimentales para minimizar los efectos de las diferencias en la afinidad de unión.

Los anticuerpos anti-antígeno IL-21 pueden ser también útiles en ensayos diagnósticos para la proteína IL-21, *v.g.*, detectando su expresión en células o tejidos específicos o en suero. Se pueden usar anticuerpos asignados a diferentes bins y capaces de unirse a diferentes porciones inmunogénicas, o epitopos, de IL-21 como reactivos para ensayos en sándwich. En un ensayo en sándwich, el analito de la muestra de ensayo es capturado por un primer anticuerpo que está inmovilizado sobre un vehículo sólido y se detecta después mediante un segundo anticuerpo que también se une al analito, formando así un complejo insoluble de tres partes. Véase, *v.g.*, la Patente EE.UU. N° 4.376.110. El segundo anticuerpo puede a su vez estar marcado con un resto detectable (ensayos directos en sándwich) o puede ser medido usando un anticuerpo antiinmunoglobulina que está marcado con un resto detectable (ensayo indirecto en sándwich). Por ejemplo, un tipo de ensayo en sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el resto detectable es una enzima.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser estudiados en cuanto a unión específica por cualquier método conocido en la técnica. Se pueden usar muchos formatos de ensayo de unión competitiva diferentes para el binning epitópico. Como inmunoensayos que se pueden utilizar, se incluyen, aunque sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como transferencia Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas), inmunoensayos "en sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitinas, reacciones de precipitinas por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes o inmunoensayos con proteína A, por nombrar sólo unos cuantos. Dichos ensayos son rutinarios y son bien conocidos en la técnica (véase, *v.g.*, Ausubel y col., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York). Se describen brevemente inmunoensayos ejemplares a continuación (pero no se pretende que sean limitativos). Adicionalmente, se puede realizar un ensayo rutinario de bloqueo cruzado, tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed. Harlow and David Lane (1988).

El Biacore es sólo uno de varios formatos de ensayo rutinariamente utilizados para determinar los epitopos de paneles de bins de anticuerpos monoclonales. Muchas referencias (*v.g.*, *The Epitope Mapping Protocols, Methods in Molecular Biology*, Volumen 6.6, Glenn E. Morris ed.) describen métodos alternativos que podrían ser utilizados para

el binning de anticuerpos y se esperaría que proporcionaran idéntica información en cuanto a la especificidad de unión de los anticuerpos a la proteína IL-21. Al utilizar el sistema Biacore, se realizan experimentos de binning epitópico con antígeno nativo soluble. Se pueden realizar estudios de binning epitópico en un sistema Biacore1000® (Biacore, Uppsalla, Suecia). Se puede usar el programa BIAlogue® v. 1.2 para programar los métodos de operación.

5 En caso de utilizar el Biacore para el binning de anticuerpos monoclonales de ratón producidos frente a IL-21, se puede inmovilizar covalentemente anticuerpo Fc de IgG de cabra antirratón policlonal (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) en un chip sensor Biacore® CM5 y utilizarlo para unir (capturar) el anticuerpo monoclonal primario de series de ensayo al chip. Los sitios de unión de Fc inocuados sobre el chip son entonces bloqueados usando un fragmento Fc de IgG policlonal (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). A

10 continuación, se inyecta proteína IL-21 y se deja que se una específicamente al anticuerpo monoclonal primario capturado. El instrumento Biacore mide la masa de proteína unida al chip sensor, y se puede verificar la unión tanto del anticuerpo primario como del antígeno IL-21 para cada ciclo. Tras la unión del anticuerpo primario y del antígeno al chip, se inyecta anticuerpo secundario soluble y se deja que se una al antígeno preunido. Si el anticuerpo monoclonal secundario es capaz de unirse al antígeno IL-21 simultáneamente al anticuerpo monoclonal primario, se

15 detecta su unión mediante el Biacore. Si, sin embargo, el anticuerpo monoclonal secundario no es capaz de unirse al antígeno IL-21 simultáneamente al anticuerpo monoclonal primario, no se detecta ninguna unión adicional. Cada anticuerpo monoclonal es estudiado frente a sí mismo como control negativo para establecer el nivel de la señal de fondo (ausencia de unión).

20 También se puede usar un formato de ELISA competitivo libre de marcaje ("LFC-ELISA") para el binning de anticuerpos. Este método está descrito por Nagata y col., J. Immuno Methods 292: 141-155, 2004. Este método para el binning epitópico utilizaba IL-21 biotinilada. Para el caso del binning de anticuerpos monoclonales de ratón producidos frente a IL-21, se revisten placas de microtitulación a razón de 100 µl/pocillo con 1 µg/ml de un anticuerpo específico Fc-γ de IgG de cabra antirratón (Jackson ImmunoResearch) diluido en ELISA B (PBS, Tween

25 20 al 0,1 %, BSA al 1 %). Después de la unión de este anticuerpo de revestimiento durante 3 horas a temperatura ambiente, se diluye cada medio acondicionado que contiene mAb en ELISA B para obtener una concentración aproximada de mAb de 0,5 µg/ml, y se deja unir a las placas revestidas con IgG de cabra antirratón durante la noche a 4°C (mAb#1). Paralelamente, se diluyen un segundo conjunto de medios acondicionados (mAb#2) en tubos de ensayo de poliestireno hasta aproximadamente 0,5 µg/ml de mAb en ELISA B, se mezclan con 50 ng/ml de antígeno

30 IL-21 biotinilado y se incuban durante la noche a 4°C. Tras la incubación de mAb#1 con el anticuerpo de revestimiento, se bloquean las placas con un anticuerpo no relacionado para saturar los sitios de unión no ocupados en la placa. Se añaden las mezclas mAb#2-biotina-IL-21 a la placa y se deja que se unan. Como control para (no competición) en el ensayo, se añaden directamente 50 ng/ml de IL-21 biotinilada (sin preincubación con mAb#2) a los pocillos que contienen mAb#1 inmovilizado. Después de incubar con el complejo IL-21 biotinilada-mAb#2, se

35 añade estreptavidina-HRP (Pierce, Rockford, IL) a la placa a 0,5 µg/ml. Se revelan las placas con substrato TMB (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y se mide la absorbancia de los pocillos individuales a 450 nm con un lector de placas (Molecular Devices SpectraMax®340, Sunnyvale, CA). Si mAb#1 se une a un epitopo diferente de mAb#2, el complejo biotina-IL-21-mAb#2 se unirá a la placa, para dar como resultado una elevada lectura de absorbancia. Si mAb#1 se une al mismo epitopo que mAb#2, el complejo biotina-IL-21-MAb#2 no se unirá a la placa, lo que dará como resultado una baja lectura de absorbancia.

40

Los anticuerpos de la presente invención actúan como antagonistas de la IL-21. Por ejemplo, la presente invención incluye anticuerpos que alteran las interacciones receptor/ligando de IL-21 parcial o totalmente. La invención incluye anticuerpos específicos de ligando que previenen la activación de los receptores. La invención incluye anticuerpos

45 neutralizantes que se unen al ligando y previenen la unión del ligando al receptor, así como anticuerpos que se unen al ligando, evitando así la activación del receptor, pero que no evitan que el ligando se una al receptor. La activación del receptor (es decir, la señalización) puede ser determinada por técnicas descritas en el presente documento o por lo demás conocidas en este campo. Por ejemplo, la activación del receptor puede ser determinada detectando la fosforilación (v.g., tirosina o serina/treonina) del receptor o de su substrato por inmunoprecipitación seguida de

50 transferencia Western o análisis basado en luminex (por ejemplo, como se ha descrito anteriormente). En realizaciones específicas, se proporcionan anticuerpos que inhiben la actividad del ligando o del receptor en al menos un 90 %, al menos un 80 %, al menos un 70 %, al menos un 60 % o al menos un 50 % de la actividad en ausencia del anticuerpo.

55 Producción de anticuerpos anti-IL-21

Se pueden obtener anticuerpos para IL-21, por ejemplo, usando el producto de un vector de expresión de IL-21 o IL-21 aislada de una fuente natural como antígeno. Los anticuerpos anti-IL-21 particularmente útiles "se unen específicamente" a la IL-21. Se considera que los anticuerpos tienen unión específica si los anticuerpos exhiben al

60 menos una de las dos propiedades siguientes: (1) los anticuerpos se unen a IL-21 con un nivel umbral de actividad de unión y (2) los anticuerpos no presentan reacción cruzada significativa con polipéptidos relacionados con IL-21.

Con respecto a la primera característica, los anticuerpos se unen específicamente si se unen a un polipéptido, péptido o epitopo de IL-21 con una afinidad de unión (K_a) de $10^6 M^{-1}$ o mayor, preferentemente de $10^7 M^{-1}$ o mayor, más preferentemente de $10^8 M^{-1}$ o mayor y más preferentemente de $10^9 M^{-1}$ o mayor. La afinidad de unión de un

65

anticuerpo puede ser fácilmente determinada por alguien con conocimientos ordinarios en la técnica, por ejemplo, por análisis de Scatchard (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51: 660, 1949) o usando un instrumento biosensor comercial (BIAcore, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ). Con respecto a la segunda característica, los anticuerpos no presentan reacción cruzada significativa con moléculas polipeptídicas relacionadas, por ejemplo, si detectan IL-21, pero no otros polipéptidos conocidos, usando un análisis de transferencia Western o un ELISA de captura estándar. Como ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos, se incluyen miembros conocidos de la familia IL-2.

Se pueden producir anticuerpos anti-IL-21 usando péptidos y polipéptidos portadores de epitopos de IL-21 antigénicos. Los péptidos y polipéptidos portadores de epitopos antigénicos de la presente invención contienen una secuencia de al menos nueve, o de entre 15 y aproximadamente 30, aminoácidos contenidos en el N° ID. SEC.: 2 u otra secuencia de aminoácidos divulgada en el presente documento. Sin embargo, péptidos o polipéptidos que comprendan una porción mayor de una secuencia de aminoácidos de la invención, que contenga de 30 a 50 aminoácidos, o cualquier longitud hasta, e inclusive, la totalidad de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención, son también útiles para inducir anticuerpos que se unan a IL-21. Es deseable seleccionar la secuencia de aminoácidos del péptido portador de epitopo de manera que proporcione una solubilidad substancial en solventes acuosos (es decir, que la secuencia incluye residuos relativamente hidrofílicos, mientras que normalmente se evitan los residuos hidrofóbicos). Más aún, también pueden ser deseables secuencias de aminoácidos que contengan residuos de prolina para la producción de anticuerpos.

Se pueden generar anticuerpos anti-IL-21 monoclonales por métodos conocidos para los expertos en la técnica. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales de roedores para antígenos específicos por métodos conocidos (véanse, 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)).

La selección de ligantes a partir de la exhibición de una librería de fragmentos de anticuerpos es una alternativa *in vitro* al desarrollo de anticuerpos monoclonales. El principio de la tecnología de exhibición es el establecimiento de una conexión física entre un resto de unión y el material genético codificante. Este concepto ha sido utilizado en una serie de modos, desde la exhibición de librerías de proteínas y de péptidos sobre las superficies de bacteriófagos, bacterias y levaduras hasta la exhibición de proteínas unidas a ribosomas *in vitro* (véase, por ejemplo Rothe y col., FASEB J. 20: 1599 (2006)). La exhibición de anticuerpos sobre la superficie de bacteriófagos de una sola hebra es la más altamente desarrollada de estas tecnologías. El método típico utilizado para la exhibición de anticuerpos es fusionar o bien el fragmento Fv de una sola cadena, o bien el Fd de cadena pesada (porción de cadena pesada de un Fab) con la proteína del gen III del fago. Las librerías de anticuerpos pueden ser naïf, representando el repertorio inmune natural, o semisintéticas, consistentes en marcos tomados de plantillas humanas nativas en combinación con librerías de secuencias CDR sintéticas para aumentar la diversidad. Se pueden aislar fagos con actividades de unión específica de librerías aleatorias de fragmentos de anticuerpos (en particular, Fab y scFv) o péptidos tras rondas repetidas de crecimiento y selección (véase, por ejemplo, Hoogenboom, Nature Biotech. 23: 1105 (2005)).

En otra realización, también se pueden generar los anticuerpos de la presente invención usando diversos métodos de exhibición de fagos conocidos en la técnica. En los métodos de exhibición de fagos, se exhiben dominios de anticuerpos funcionales sobre la superficie de partículas de fagos que llevan las secuencias polinucleotídicas que los codifican. En particular, dichos fagos pueden ser utilizados para exhibir dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o librería combinatoria de anticuerpos (*v.g.*, humana o murina). Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés pueden ser seleccionados o identificados con antígeno, *v.g.*, utilizando antígeno marcado o antígeno unido o capturado sobre una superficie sólida o perla. Los fagos usados en estos métodos son normalmente fagos filamentosos que incluyen los dominios de unión fd y M13 expresados a partir de fagos con dominios de anticuerpos Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuro recombinantemente fusionados a la proteína del gen III o del gen VIII del fago. Como ejemplos de métodos de exhibición de fagos que pueden ser usados para producir los anticuerpos de la presente invención, se incluyen los divulgados 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); solicitud PCT N° PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982 y WO 95/20401, y Patentes EE.UU. 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; cada uno de los cuales es incorporado en el presente documento como referencia en su totalidad. En aún otra realización, se pueden aislar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de librerías 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), describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando librerías de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de gran afinidad (rango nM) por redistribución de cadena (Marks y col., Bio/Technology, 10: 779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir librerías muy grandes de fagos (Waterhouse y col., Nuc. Acids. Res., 21: 2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de

hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Como se describe en las referencias anteriores, tras la selección de los fagos, se pueden aislar las regiones codificantes de anticuerpo de los fagos y usarlas para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarlas en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células de plantas, levaduras y bacterias, *v.g.*, como se describe con detalle más adelante. Por ejemplo, también se pueden emplear técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ usando métodos conocidos en este campo, tales como los divulgados 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 (siendo todas las referencias incorporadas a modo de referencia en su totalidad).

También se pueden producir anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que sean incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que puedan expresar genes de inmunoglobulinas humanas. Por ejemplo, se pueden introducir los complejos de los genes de inmunoglobulinas de cadenas pesadas y ligeras humanos aleatoriamente o por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, se pueden introducir la región variable, la región constante y la región de diversidad humanas en células madre embrionarias de ratón además de los genes de cadenas pesadas y ligeras humanos. Se puede hacer que los genes de inmunoglobulinas de cadenas pesadas y ligeras de ratón sean no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulinas humanas por recombinación homóloga. En particular, la delección homocigótica de la región JH evita la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas son expandidas y microinyectadas en blastocistos para producir ratones quiméricos. Se reproducen luego los ratones quiméricos para producir una descendencia homocigótica que exprese anticuerpos humanos. Se inmuniza a los ratones transgénicos en la forma habitual con un antígeno seleccionado, *v.g.*, todo o una porción de un polipéptido de la invención. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno de los ratones transgénicos inmunizados usando tecnología de hibridomas convencional. Los transgenes de inmunoglobulinas humanas albergados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de las células B y posteriormente sufren cambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión de conjunto de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (*Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93. 1995).

Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y de protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, *v.g.*, Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggermann y col., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993); publicaciones PCT WO 98/24893, WO 96/34096 y WO 96/33735; y Patentes EE.UU. Nº 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, que se incorporan como referencia en el presente documento en su totalidad. Además, compañías tales como Medarex, Inc. (Princeton, New Jersey) y Genpharm (San José, Calif.) pueden encargarse de proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando una tecnología similar a la antes descrita. Véase, *v.g.*, la Patente EE.UU. 7.135.287.

Los anticuerpos de la invención pueden ser producidos por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química, o preferentemente, por técnicas de expresión recombinante. La expresión recombinante de un anticuerpo de la invención, o de un fragmento, derivado o análogo del mismo, *v.g.*, 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 obtenido un polinucleótido codificante de una molécula de anticuerpo o de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o de una porción del mismo (preferentemente que contenga el dominio variable de cadena pesada o ligera) de la invención, se puede producir el vector para la producción de la molécula de anticuerpo por tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en este campo. Así, se describen en el presente documento métodos para preparar una proteína expresando un polinucleótido que contiene una secuencia nucleotídica codificante de un anticuerpo. Se pueden usar métodos que son bien conocidos para los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpos y señales de control de la transcripción y de la traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. La invención, por lo tanto, proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia nucleotídica codificante de una molécula de anticuerpo de la invención, o de una cadena pesada o ligera del mismo, o de un dominio variable de cadena pesada o ligera, operativamente unida a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia nucleotídica codificante de la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, *v.g.*, la Publicación PCT WO 86/05807, la Publicación PCT WO 89/01036 y la Patente EE.UU. Nº 5.122.464), y se puede clonar el dominio variable del anticuerpo en dicho vector para expresión de la totalidad de la cadena pesada o ligera.

Se transfiere el vector de expresión a una célula huésped por técnicas convencionales y se cultivan entonces las células transfectadas por técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención. Así, la invención incluye células huésped que contienen un polinucleótido codificante de un anticuerpo la invención, o de una cadena pesada o ligera del mismo, operativamente unido a un promotor heterólogo. En realizaciones preferidas para la expresión de anticuerpos de doble cadena, se pueden coexpresar vectores codificantes de las cadenas tanto pesadas como ligeras en la célula huésped para la expresión de toda la molécula de inmunoglobulina, como se detalla a continuación.

- Se pueden utilizar varios sistemas huésped-vector de expresión para expresar las moléculas de anticuerpos de la invención. Dichos sistemas huésped-vector de expresión representan vehículos mediante los cuales se pueden producir y posteriormente purificar las secuencias codificantes de interés, pero también representan células que, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes nucleotídicas apropiadas, pueden expresar una molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estos incluyen, aunque sin limitación, microorganismos tales como bacterias (*v.g.*, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago, ADN de plásmido o ADN de cósmido recombinante que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levaduras (*v.g.*, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (*v.g.*, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de plantas infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (*v.g.*, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (*v.g.*, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de células de mamíferos (*v.g.*, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (*v.g.*, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (*v.g.*, MPSV, CMV, el promotor tardío de adenovirus, el promotor 7.5K del virus de la vaccinia). Preferentemente, se usan células bacterianas, tales como *Escherichia coli*, y más preferentemente células eucarióticas, especialmente para la expresión de moléculas de anticuerpo recombinantes completas, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, células de mamífero tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), conjuntamente con un vector, tal como el elemento promotor del gen precoz intermedio mayor del citomegalovirus humano, el potenciador de CMV o el promotor de MPSV, son un sistema de expresión efectivo para anticuerpos (Foecking y col., 1986, *Gene* 45: 101; Cockett y col., 1990, *Bio/Technology* 8:2).
- En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente una serie de vectores de expresión dependiendo del uso al que se destine la molécula de anticuerpo que está siendo expresada. Por ejemplo, cuando se ha de producir una gran cantidad de dicha proteína para generar composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirijan la expresión de grandes niveles de productos de proteínas de fusión que sean fácilmente purificados. Dichos vectores incluyen, aunque sin limitación, el vector de expresión en *E. coli* pUR278 (Ruther y col., 1983, *EMBO J.* 2: 1791), en el que se puede ligar individualmente la secuencia codificante del anticuerpo al vector en marco con la región codificante lac Z, de tal forma que se produce una proteína de fusión; los vectores pIN (Inouye & Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13: 3101-3109, 1985; Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 24: 5503-5509, 1989); y similares. También se pueden usar los vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con la glutatión S-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y pueden ser fácilmente purificadas a partir de células lisadas por adsorción y unión a una matriz de glutatión-perlas de agarosa, seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión de proteasas de trombina o factor Xa, de tal forma que el producto génico diana clonado puede liberarse del resto GST.
- En un sistema de insectos, se usa el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. Se puede clonar la secuencia codificante del anticuerpo individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la poliedrina) del virus y ponerla bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de la poliedrina).
- En células huésped de mamíferos, se pueden utilizar una serie de sistemas de expresión basados en virus. En casos en los que se utiliza un adenovirus como vector de expresión, se puede ligar la secuencia codificante del anticuerpo de interés con un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, *v.g.*, la secuencia del promotor tardío y del líder tripartito. Este gen quimérico puede luego ser insertado en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma vírico (*v.g.*, región E1 o E3) dará lugar a un virus recombinante viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en hospedadores infectados (*v.g.*, véase Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 355-359, 1984). También pueden ser necesarias señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de las secuencias codificantes de anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción de toda la inserción. Estas señales de control de la traducción exógenas y estos codones de iniciación pueden ser de varios orígenes, tanto naturales como sintéticos. Se puede aumentar la eficacia de la expresión mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción, finalizadores de la transcripción, etc. apropiados (véase Bittner y col., *Methods in Enzymol.* 153: 51-544, 1987).
- Además, se puede seleccionar una cepa de células huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. Dichas modificaciones (*v.g.*, glicosilación) y procesamiento (*v.g.*, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento y la modificación posteriores a la traducción de proteínas y productos génicos. Se pueden seleccionar líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Con este fin, se pueden usar células huésped eucarióticas que posean la maquinaria celular

para el apropiado procesamiento del transcrito primario, la glicosilación y la fosforilación del producto génico. Dichas células huésped de mamíferos incluyen, aunque sin limitación, CHO, VERO, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38 y, en particular, líneas celulares de cáncer de mama, tales como, por ejemplo, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, y líneas celulares de glándula mamaria normal, tales como, por ejemplo, CRL7030 y Hs578Bst.

5 Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, se pueden someter a ingeniería líneas celulares que expresen de manera estable la molécula de anticuerpo. Más que utilizar vectores de expresión que contengan orígenes de replicación víricos, las células huésped pueden ser transformadas con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (v.g.,
10 promotor, potenciador, secuencias, finalizadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, se puede dejar que las células sometidas a ingeniería crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido y se las cambia luego a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar focos, los cuales, a su vez, pueden ser
15 clonados y expandidos en líneas celulares. Este método puede ser ventajosamente utilizado para someter a ingeniería líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo. Dichas líneas celulares sometidas a ingeniería pueden ser particularmente útiles en el cribado y la evaluación de compuestos que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

20 Se pueden usar una serie de sistemas de selección, incluyendo, aunque sin limitación, los genes de la timidina kinasa del virus *Herpes simplex* (Wigler y col., Cell 11: 223, 1977), de la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 202, 1992) y de la adenina fosforibosiltransferasa (Lowy y col., Cell 22: 817, 1980), que pueden ser empleados en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, se puede usar la resistencia antimetabolitos como base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia
25 al metotrexato (Wigler y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 357, 1980; O'Hare 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 aminoglicósido 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
30 resistencia a la higromicina (Santerre y col., Gene 30: 147, 1984). Se describen métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante que pueden ser utilizados en Ausubel y col. (eds.), 1993, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; en 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, los cuales son
35 incorporados como referencia en el presente documento en su totalidad.

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

45 La célula huésped puede ser cotransfectada con dos vectores de expresión de la invención, codificando el primer vector un polipéptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permitan igual expresión de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, se puede usar un solo vector que codifique ambos polipéptidos de cadena pesada y ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debería situarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, Nature 322: 52, 1986; Kohler, Proc. Natl.
50 Acad. Sci. USA 77: 2197, 1980). Las secuencias codificantes para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez se ha expresado recombinantemente una molécula de anticuerpo de la invención, ésta puede ser purificada por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (v.g., cromatografía columna de intercambio iónico, de afinidad, particularmente por afinidad para el antígeno específico tras Proteína A, y de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

60 Para usos particulares, puede ser deseable preparar fragmentos de anticuerpos anti-IL-21. Dichos fragmentos de anticuerpo pueden ser obtenidos, por ejemplo, por hidrólisis proteolítica del anticuerpo. Se pueden obtener fragmentos de anticuerpo por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales. Como ilustración, se pueden producir fragmentos de anticuerpo por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina, para obtener un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Se puede volver a escindir este fragmento usando un agente reductor tiol, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3,5S. Eventualmente, la
65 reacción de escisión puede ser llevada a cabo usando un grupo bloqueante para los grupos sulfhidrilo que resultan

de la escisión de uniones disulfuro. Como alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos están descritos, por ejemplo, por Goldenberg, Patente EE.UU. N° 4.331.647; Nisonoff y col., Arch Biochem. Biophys. 89: 230, 1960; Porter, Biochem. J. 73: 119, 1959; Edelman y col., Methods in Enzymology Vol. 1, página 422 (Academic Press 1967), y Coligan, en las páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4.

Se pueden usar también otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como la separación de las cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, una mayor escisión de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno reconocido por el anticuerpo intacto.

Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas VH y VL. Esta asociación puede ser no covalente, como describen Inbar y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69: 2659, 1972. Alternativamente, se pueden unir las cadenas variables por un enlace disulfuro intermolecular o entrecruzar mediante agentes químicos, tales como el glutaraldehído (véase, por ejemplo, Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12: 437, 1992).

Los fragmentos Fv pueden comprender cadenas VH y VL que se conectan por un conector peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno de una sola cadena (scFv) son preparadas construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN codificantes de los dominios VH y VL que se conectan mediante un oligonucleótido. El gen estructural es insertado 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 polipeptídica con un péptido conector que hace puente entre los dos dominios V. Se describen métodos para producir scFv, por ejemplo, en Whitlow y col., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 97 (1991) (véanse también Bird y col., Science 242: 423, 1988; Ladner y col., Patente EE.UU. N° 4.946.778; Pack y col., Bio/Technology 11: 1271, 1993, y Sandhu, antes citado).

Como ilustración, se puede obtener un scFV exponiendo linfocitos a polipéptido IL-21 *in vitro* y seleccionando librerías de exhibición de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, mediante el uso de proteína o péptido IL-21 inmovilizado o marcado). Se pueden obtener genes codificantes de polipéptidos que tienen dominios potenciales de unión al polipéptido IL-21 cribando librerías peptídicas aleatorias exhibidas sobre fagos (exhibición de fagos) o sobre bacterias, tales como *E. coli*. Se pueden obtener secuencias nucleotídicas codificantes de los polipéptidos de una serie de formas, tal como a través de mutagénesis aleatoria y síntesis de polinucleótidos aleatoria. Se pueden usar estas librerías de exhibición de péptidos aleatorias para hacer un cribado de péptidos que interaccionan con una diana conocida, que puede ser una proteína o un polipéptido, tal como un ligando o un receptor, una macromolécula biológica o sintética o sustancias orgánicas o inorgánicas. Las técnicas para crear y cribar dichas librerías de exhibición de péptidos aleatorias son conocidas en este campo (Ladner y col., Patente EE.UU. N° 5.223.409; Ladner y col., Patente EE.UU. N° 4.946.778; Ladner y col., Patente EE.UU. N° 5.403.484; Ladner y col., Patente EE.UU. N° 5.571.698, y Kay y col., Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press, Inc. 1996)) y se dispone comercialmente de librerías de exhibición de péptidos aleatorias y de kits para cribar dichas librerías, por ejemplo de CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Se pueden cribar las librerías de exhibición de péptidos aleatorias usando las secuencias de IL-21 divulgadas en el presente documento para identificar proteínas que se unen a IL-21.

Otra forma de fragmento de anticuerpo es un péptido codificante de una sola región determinante de complementariedad (CDR). Se pueden obtener péptidos CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") construyendo genes codificantes de la CDR de un anticuerpo de interés. Se preparan dichos genes, por ejemplo, usando la reacción en cadena de polimerasa para sintetizar la región variable a partir de ARN de células productoras de anticuerpo (véanse, 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: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter y col. (eds.), 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., (eds.), página 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)).

Alternativamente, un anticuerpo anti-IL-21 puede derivar de un anticuerpo monoclonal "humanizado". Se producen anticuerpos monoclonales humanizados transfiriendo regiones determinantes de complementariedad de ratón o de rata de cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de ratón a un dominio variable humano. Se substituyen entonces residuos típicos de anticuerpos humanos en las regiones de marco de las contrapartidas murinas. El uso de componentes de anticuerpos derivados de anticuerpos monoclonales humanizados obvia problemas potenciales asociados a la inmunogenicidad de las regiones constantes murinas. Se describen técnicas generales para clonar dominios variables de inmunoglobulinas murinas, por ejemplo, en Orlandi y col., Proc. Nat'l 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. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 4285, 1992; Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12: 437, 1992; Singer y col., 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 Queen y col.,

Patente EE.UU. Nº 5.693.762.

Es también posible construir marcos alternativos utilizando una colección de proteínas monoméricas para formar un dominio monomérico. Estos dominios monoméricos pueden ser lo suficientemente pequeños como para penetrar en los tejidos. Los dominios monoméricos pueden ser variantes naturales o no naturales o una combinación de las mismas. Los dominios monoméricos pueden formar multímeros de dos dominios más. El dominio monomérico se une a una posición, de manera análoga a los epitopos descritos en el presente documento, sobre una molécula diana. En algunos casos, el multímero puede formarse a partir de varios dominios monoméricos. (Véanse, *v.g.*, la Solicitud de Patente EE.UU. 2004-0132028 y la Solicitud de Patente EE.UU. 2006-0177831).

Los anticuerpos de la presente invención incluyen derivados que están modificados, a saber, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de tal forma que la unión covalente no impida que el anticuerpo se una a IL-21 o evite la activación del receptor. Por ejemplo, aunque no a modo de limitación, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que han sido modificados, *v.g.*, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular o a otra proteína, etc. Se puede realizar cualquiera de numerosas modificaciones químicas por técnicas conocidas, incluyendo, aunque sin limitación, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Se puede conjugar un anticuerpo anti-IL-21 con un marcaje detectable para formar un inmunoconjugado anti-IL-21. Como marcajes detectables adecuados, se incluyen, por ejemplo, un radioisótopo, un marcaje fluorescente, un marcaje quimioluminiscente, un marcaje enzimático, un marcaje bioluminiscente u oro coloidal. Los métodos de preparación y detección de dichos inmunoconjugados detectablemente marcados son bien conocidos para quienes tienen conocimientos ordinarios en la técnica y se describen con más detalle a continuación. El marcaje detectable puede ser un radioisótopo que se detecta por autorradiografía. Son isótopos particularmente útiles para los fines de la presente invención ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S y ^{14}C .

Los inmunoconjugados anti-IL-21 pueden ser también marcados con un compuesto fluorescente. Se determina la presencia de un anticuerpo fuorescentemente marcado exponiendo el inmunoprecipitado a luz de la longitud de onda apropiada y detectando la fluorecencia resultante. Como compuestos marcadores fluorescentes, se incluyen isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofococianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

Es también posible poder marcar los inmunoconjugados anti-IL-21 detectablemente copulando un componente de anticuerpo con un compuesto quimioluminiscente. Se determina la presencia del inmunoconjugado con marcaje quimioluminiscente detectando la presencia de luminiscencia que surge en el curso de una reacción química. Como ejemplos de compuestos marcadores quimioluminiscentes, se incluyen luminol, isoluminol, un éster de acridinio aromático, un imidazol, una sal de acridinio y un éster de oxalato.

De forma similar, se puede usar un compuesto bioluminescente para marcar los inmunoconjugados anti-IL-21 de la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia que se encuentra en sistemas biológicos, en donde una proteína catalítica aumenta la eficacia de la reacción quimioluminiscente. Se determina la presencia de una proteína bioluminescente detectando la presencia de luminiscencia. Como compuestos bioluminescentes útiles para marcaje, se incluyen luciferina, luciferasa y aecuorina.

Alternativamente, se pueden marcar detectablemente inmunoconjugados anti-IL-21 uniendo un componente de anticuerpo anti-IL-21 a una enzima. Cuando se incuba el conjugado anti-IL-21-enzima en presencia del substrato apropiado, el resto enzimático reacciona con el substrato para producir un resto químico que puede ser detectado, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorométricos o visuales. Como ejemplos de enzimas que pueden ser usadas para marcar detectablemente inmunoconjugados poliespecíficos, se incluyen β -galactosidasa, glucosa oxidasa, peroxidasa y fosfatasa alcalina.

Los expertos en la técnica conocerán otros marcajes adecuados que pueden emplearse según la presente invención. Se puede conseguir la unión de restos marcadores a anticuerpos anti-IL-21 usando técnicas estándar conocidas en este campo. Se describe metodología típica en este sentido en 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, antes citado.

Más aún, se pueden aumentar la conveniencia y la versatilidad de la detección inmunoquímica usando anticuerpos anti-IL-21 que han sido conjugados con avidina, estreptavidina y biotina (véanse, 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", en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, Manson (ed.), páginas 149-162 (The Humana Press, Inc. 1992).

Los métodos para realizar inmunoensayos están bien establecidos. Véanse, 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 and Lennox (eds.), páginas 107-120 (Wiley-Liss, Inc. 1995), y Diamandis, *Immunoassay* (Academic Press, Inc. 1996).

5 Se pueden generar anticuerpos o fragmentos de los mismos con mayores vidas medias *in vivo* por técnicas conocidas para los expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden generar anticuerpos o fragmentos de los mismos con mayores vidas medias *in vivo* modificando (*v.g.*, substituyendo, suprimiendo o añadiendo) residuos de aminoácidos identificados como implicados en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn (véanse, *v.g.*, las Publicaciones Internacionales Nº WO 97/34631 y WO 02/060919, incorporadas en el presente documento como referencia en su totalidad). Se pueden generar anticuerpos o fragmentos de los mismos con mayores vidas medias *in vivo* uniendo a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos moléculas poliméricas, tales como polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular. Se puede unir el PEG a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos con o sin un conector multifuncional por conjugación específica de sitio del PEG al extremo N o C de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos o por medio de grupos épsilon-amino presentes en residuos de lisina. Se utilizará derivatización de polímeros lineales o ramificados que dé lugar a una mínima pérdida de actividad biológica. El grado de conjugación será estrechamente monitorizado por SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la apropiada conjugación de moléculas de PEG con los anticuerpos. Se puede separar el PEG no reaccionado de los conjugados anticuerpo-PEG por, *v.g.*, cromatografía de exclusión por tamaño o de intercambio iónico.

20 Composiciones farmacéuticas

La presente invención incluye además composiciones farmacéuticas, que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y un polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento. La composición farmacéutica puede incluir agentes terapéuticos adicionales, incluyendo, aunque sin limitación, agentes citotóxicos o citotoxinas, *v.g.*, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ion metálico radiactivo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea nocivo para las células. Como ejemplos, se incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y sus análogos u homólogos. Como agentes terapéuticos, se incluyen, aunque sin limitación, antimetabolitos (*v.g.*, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (*v.g.*, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiaminoplatino (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (*v.g.*, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (*v.g.*, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)) y agentes antimetabólicos (*v.g.*, vincristina y vinblastina). Por ejemplo, la composición farmacéutica puede incluir una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de la difteria; una proteína, tal como el factor de necrosis tumoral, α -IFN, β -IFN, el factor de crecimiento de los nervios, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el activador del plasminógeno de los tejidos, un agente trombótico o un agente antiangiogénico, *v.g.*, angiostatina o endostatina; o modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-6 ("IL-6"), factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de las colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

45 Con fines de terapia, se administran moléculas de anticuerpo anti-IL-21 y un vehículo farmacéuticamente aceptable a un paciente en una cantidad terapéuticamente efectiva. Se dice que se administra una combinación de una molécula terapéutica de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable en una "cantidad terapéuticamente efectiva" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia da lugar a 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.

Una composición farmacéutica que contiene anticuerpo anti-IL-21 puede ser presentada en forma líquida, en un aerosol o en forma sólida. Las formas líquidas son ilustradas por soluciones inyectables y suspensiones orales. Como formas sólidas ejemplares, se incluyen cápsulas, tabletas y formas de liberación controlada. Esta última forma es ilustrada por bombas miniosmóticas 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 and 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 and Hendren (eds.), páginas 93-117 (Plenum Press 1997)).

Los liposomas proporcionan un medio para suministrar polipéptidos terapéuticos a un sujeto intravenosa, intraperitoneal, intratecal, intramuscular o subcutáneamente, o por administración oral, inhalación o administración intranasal. Los liposomas son vesículas microscópicas que consisten en una o más bicapas lipídicas que rodean a compartimentos 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 cuanto a composición a las membranas celulares y, como resultado de ello, los liposomas pueden ser administrados de manera segura y son biodegradables. Dependiendo del método de preparación, los liposomas pueden ser unilamelares o multilamelares, y los liposomas pueden variar en cuanto a tamaño, con diámetros que van de 0,02 μm a más de 10 μm . Se pueden encapsular varios agentes en liposomas: los agentes hidrofóbicos se reparten en las bicapas y los agentes hidrofílicos se reparten en el/los espacio(s) acuoso(s) interno(s) (véanse, 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)). Más aún, es posible controlar la disponibilidad terapéutica del agente encapsulado variando el tamaño de los liposomas, el número de bicapas y la composición lipídica, así como la carga y las características superficiales de los liposomas.

Alternativamente, se pueden unir diversos ligandos de abordaje a la superficie del liposoma, tales como anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, carbohidratos, vitaminas y proteínas transportadoras. Por ejemplo, se pueden modificar los liposomas con derivados de galactosilípidos de tipo ramificado para dirigirse a los receptores de asialoglicoproteína (galactosa), que se expresan exclusivamente sobre 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 el marcaje de liposomas con asialofetuína daba lugar a un acortamiento en la vida media plasmática de los liposomas y aumentaba mucho la captación de liposomas marcados con asialofetuína por los hepatocitos. Por otra parte, se puede inhibir la acumulación hepática de liposomas que incluyen derivados de galactosilípidos de tipo ramificado por preinyección de asialofetuína (Murahashi y col., *Biol. Pharm. Bull.* 20: 259, 1997). Los liposomas de seroalbúmina humana poliacetonilada proporcionan otro enfoque para dirigir liposomas a las células hepáticas (Kamps y col., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94: 11681, 1997). Más aún, Geho y col., Patente EE.UU. N^o 4.603.044, describen un sistema de suministro de vesículas liposómicas dirigido a los hepatocitos que tiene especificidad para los receptores hepatobiliares asociados a las células metabólicas especializadas del hígado.

En un enfoque más general al abordaje de tejidos, se premarcan las células diana con anticuerpos biotinilados específicos para un ligando expresado por la célula diana (Harasym y col., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32: 99, 1998). Tras la eliminación del plasma del anticuerpo libre, se administran liposomas conjugados con estreptavidina. En otro enfoque, los anticuerpos de abordaje están directamente unidos a liposomas (Harasym y col., *ibídem* (1998)).

Los polipéptidos y anticuerpos pueden ser encapsulados en liposomas usando técnicas estándar de microencapsulación de proteínas (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*, 2^a Edición, Vol. III, Gregoriadis (ed.), página 317 (CRC Press 1993); Wassef y col., *Meth. Enzymol.* 149: 124, 1987). Como se ha indicado anteriormente, los liposomas terapéuticamente útiles pueden contener varios componentes. Por ejemplo, los liposomas pueden contener derivados lipídicos de poli(etilenglicol) (Allen y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1150: 9, 1993).

Se han diseñado microesferas de polímeros degradables para mantener elevados niveles sistémicos de proteínas terapéuticas. Se preparan las microesferas a partir de polímeros degradables, tales como poli(lactida-co-glicolida) (PLG), polianhídridos, poli(orto-ésteres) y polímeros de acetato de etilvinilo no biodegradables, en los que las proteínas están atrapadas 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 and 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 revestidas de polietilenglicol (PEG) pueden también proporcionar vehículos para administración intravenosa de proteínas terapéuticas (véase, por ejemplo, Gref y col., *Pharm. Biotechnol.* 10: 167, 1997).

Otras formas de dosificación pueden ser concebidas por los expertos en la técnica, como muestran, por ejemplo, Ansel y Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5^a Edición (Lea & Febiger 1990); Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19^a Edición (Mack Publishing Company 1995), y Ranade y Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996).

Las composiciones farmacéuticas pueden ser suministradas como un kit que comprende un envase que contiene un anticuerpo anti-IL-21 neutralizante. Se pueden presentar los polipéptidos terapéuticos en forma de una solución inyectable para dosis única o múltiple, o como un polvo estéril que será reconstituido antes de su inyección. Alternativamente, dicho kit puede incluir un dispersor de polvo seco, un generador de aerosol líquido o un nebulizador para la administración de un polipéptido terapéutico. Dicho kit puede además incluir información escrita sobre las indicaciones y el uso de la composición farmacéutica.

Una composición farmacéutica que contiene anticuerpos anti-IL-21 puede ser presentada en forma líquida, en un aerosol o en forma sólida. Las formas líquidas son ilustradas mediante soluciones inyectables, aerosoles, gotitas,

soluciones topológicas y suspensiones orales. Como ejemplos de formas sólidas, se incluyen cápsulas, tabletas y formas de liberación controlada. Esta última forma es ilustrada mediante bombas miniosmóticas 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 and 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 and Hendren (eds.), páginas 93-117 (Plenum Press 1997)). Otras formas sólidas incluyen cremas, pastas, otras aplicaciones topológicas y similares.

10 Usos terapéuticos para los anticuerpos anti-IL-21

15 IL-21 es una citoquina derivada de células T CD4⁺ importante para una óptima inmunidad mediada por células T CD8⁺, para la activación de las células NK y para óptimas respuestas humorales, tales como la producción de anticuerpos y la maduración de las células B. Se ha visto que IL-21 induce una serie de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias, tales como IL-18, IL-15, IL-5, IL-6, TNFR1I, sCD25 y RANTES. IL-21 también induce una respuesta de fase aguda en primates no humanos y en humanos. Se ha visto un aumento de la expresión del receptor de IL-21 en la epidermis de pacientes con esclerosis sistémica (Distler y col., Arthritis & Rheumatism 52: 865-864, 2004) y en los fibroblastos sinoviales en la artritis reumatoide (Jungel y col., Arthritis & Rheumatism 50: 1468-1476, 2004). Más aún, los ratones NOD diabéticos autoinmunes tienen una expresión aumentada del receptor de IL-21 (King y col., Cell 117: 265-277, 2004). Se ha visto que la expresión de IgG e IL-21 está aumentada en el modelo del ratón *Yaa* BXSB-, que desarrolla una enfermedad autoinmune de tipo lupus eritematoso (Ozaki y col., J. Immunol. 173: 5361-5371, 2004); la expresión de IL-21 es mayor en ratones *Sanroque* propensos al lupus (Vinuesa y col. Nature 435: 452, 2005); la expresión de IL-21 es mayor en pacientes con enfermedad de Crohn (Monteleone y col., Gastroenterology 128: 687-694, 2005).

25 Una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-IL-21 se refiere a una cantidad de anticuerpo que, cuando se le administra a un sujeto, es efectiva para prevenir, retrasar, reducir o inhibir un síntoma o actividad biológica asociada a una enfermedad o trastorno. La administración puede consistir en una sola dosis o en múltiples dosis y puede ser realizada en combinación con otras composiciones farmacéuticas.

30 La presente invención proporciona composiciones y métodos para la utilización de antagonistas de IL-21 en enfermedades o afecciones inflamatorias e inmunes, tales como la pancreatitis, la diabetes de tipo I (DMID), la Enfermedad de Graves, la enfermedad inflamatoria del intestino (EII), la Enfermedad de Crohn, la colitis ulcerativa, el síndrome del intestino irritable, la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, la diverticulosis, el lupus eritematoso sistémico, la psoriasis, la espondilitis anquilosante, la esclerodermia, la esclerosis sistémica, la artritis psoriásica, la osteoartritis, la dermatitis atópica, el vitíligo, la enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), el linfoma cutáneo de células T (LCCT), el síndrome de Sjogren, la glomerulonefritis, la nefropatía por IgA, la enfermedad del injerto contra el huésped, el rechazo de trasplantes, la dermatitis atópica, el síndrome antifosfolipídico y el asma, y otras enfermedades autoinmunes.

40 Dermatitis de contacto

45 La dermatitis de contacto alérgica se define como una reacción inmune mediada por células T a un antígeno que entra en contacto con la piel. Se cree que la población de células T CLA⁺ está implicada en el inicio de la dermatitis, ya que las respuestas de las células T dependientes de alérgenos están en gran medida confinadas a la población de células CLA⁺ (véase Santamaría-Babi, L.F. y col., J. Exp. Med. 181: 1935, (1995)). Datos recientes han descubierto que sólo las células T de memoria (CD45RO⁺) CD4⁺ CLA⁺, y no CD8⁺, proliferan y producen citoquinas tanto de tipo 1 (IFN- γ) como de tipo 2 (IL-5) en respuesta al níquel, un alérgeno común en la hipersensibilidad por contacto. Además, las células que expresan CLA en combinación con CD4, CD45RO (memoria) o CD69 aumentan tras estimulación específica de níquel y expresan los receptores de quimioquinas CXCR3, CCR4 y CCR10, pero no CCR6. Véase Moed H. y col., Br. J. Dermatol. 51: 32 (2004).

55 En modelos animales, se ha demostrado que la dermatitis de contacto alérgica es dependiente de las células T y que las células T de la respuesta alérgica migran al sitio de aplicación del alérgeno. Véanse, en general: 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).

Dermatitis atópica

60 La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad inflamatoria de la piel crónicamente recidivante cuya incidencia ha sufrido un dramático aumento a lo largo de las últimas décadas. A nivel clínico, la DA se caracteriza por placas y pápulas muy pruríticas, con frecuencia excoriadas, que muestran un curso recidivante crónico. El diagnóstico de la DA se basa mayormente en hallazgos clínicos mayores y menores. Véase Hanifin J.M., Arch. Dermatol. 135: 1551 (1999). La histopatología revela espongiosis, hiperparaqueratosis y paraqueratosis focal en las lesiones agudas, mientras que una marcada hiperplasia epidérmica con hiperparaqueratosis y paraqueratosis, acantosis/hipergranulosis e infiltración perivascular de la dermis con linfocitos y abundantes células cebadas son el

distintivo de las lesiones crónicas.

Las células T tienen un papel central en el inicio de las respuestas inmunes locales en los tejidos, y la evidencia sugiere que las células T que se infiltran en la piel, en particular, pueden tener un papel clave en el inicio y el mantenimiento de las respuestas inmunes descontroladas en la piel. Aproximadamente un 90 % de las células T infiltrantes en sitios inflamatorios cutáneos expresan el Ag asociado a linfocitos cutáneos (CLA+), que se une a la E-selectina, una molécula de adhesión inducible sobre el endotelio (revisado en Santamaría-Babi L.F. y col., Eur. J. Dermatol. 14: 13, (2004)). Se ha documentado un significativo aumento en las células T CLA+ circulantes entre los pacientes con DA en comparación con individuos control (véase Teraki Y. y col., Br. J. Dermatol. 143: 373 (2000), mientras que otros han demostrado que las células T CLA+ de memoria de pacientes con DA responden preferencialmente a extracto de alérgeno en comparación con la población CLA- (véase Santamaría-Babi, L.F. y col., J. Exp. Med. 181: 1935, (1995)). En humanos, se ha asociado la patogenia de los trastornos atópicos de la piel a aumentos en las células T CLA+ que expresan mayores niveles de citoquinas de tipo Th-2, como la IL-5 y la IL-13. Véanse Akdis M. y col., Eur. J. Immunol. 30: 3533 (2000), y Hamid Q. y col., J. Allergy Clin. Immunol. 98: 225 (1996).

Los ratones NC/Nga desarrollan espontáneamente lesiones de tipo DA que guardan un paralelismo con la DA humana en muchos aspectos, incluyendo el curso y los signos clínicos, la histopatología y la inmunopatología, cuando se les alberga en condiciones no libres de patógenos especificados (no SPF) hacia las 6-8 semanas de edad. Por el contrario, los ratones NC/Nga mantenidos en condiciones SPF no desarrollan lesiones cutáneas. Sin embargo, se pueden sincronizar la aparición de lesiones cutáneas espontáneas y el comportamiento de rascado en ratones NC/Nga albergados en una instalación SPF por inyección intradérmica semanal de antígeno bruto de ácaros del polvo. Véase Matsuoka H. y col., Allergy 58: 139 (2003). Por lo tanto, el desarrollo de DA en NC/Nga es un modelo útil para la evaluación de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de la DA.

Además del modelo NC/Nga de DA espontánea, también se puede usar la sensibilización epicutánea de ratones usando OVA como modelo para inducir engrosamiento epidérmico y dérmico dependiente de antígeno con un infiltrado mononuclear en la piel de ratones sensibilizados. Esto coincide normalmente con niveles séricos elevados de IgE total y específica; sin embargo, en este modelo normalmente no se produce ninguna disfunción de la barrera cutánea o prurito. Véase Spergel J.M. y col., J. Clin. Invest., 101: 1614, (1998). Este protocolo puede ser modificado con objeto de inducir disregulación de la barrera cutánea y prurito por sensibilización de ratones transgénicos DO11.10 OVA TCR con OVA. El aumento del número de células T específicas de antígeno que podrían reconocer el antígeno sensibilizante puede aumentar el nivel de inflamación en la piel para inducir un comportamiento visible de rascado y liquenificación/descamación de la piel.

Artritis

La artritis, incluyendo la osteoartritis, la artritis reumatoide, las articulaciones artríticas como resultado de una lesión y similares, son afecciones inflamatorias comunes que se beneficiarían del uso terapéutico de anticuerpos y polipéptidos de unión antiinflamatorios. 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 que causa dolor, rigidez, calor, enrojecimiento e hinchazón. Las células inflamatorias liberan enzimas que pueden digerir el hueso y el cartílago. Como resultado de la artritis reumatoide, el revestimiento de la articulación inflamada, el sinovio, puede invadir y dañar el hueso y el cartílago, para dar lugar a deterioro articular y dolor severo, entre otros efectos fisiológicos. La articulación implicada puede perder su forma y alineación, lo que da como resultado dolor y pérdida de movimiento.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inmunomediada particularmente caracterizada por inflamación y posterior daño tisular, lo que da lugar a una severa discapacidad y a un aumento en la mortalidad. Se producen localmente varias citoquinas en las articulaciones reumatoides. Numerosos estudios han demostrado que la IL-1 y el TNF-alfa, dos citoquinas proinflamatorias prototípicas, tienen un importante papel en los mecanismos implicados en la inflamación sinovial y en la progresiva destrucción articular. Ciertamente, la administración de inhibidores del TNF-alfa y de la IL-1 en pacientes con AR ha dado lugar a una dramática mejoría de los signos clínicos y biológicos de la inflamación y a una reducción de los signos radiológicos de erosión del hueso y destrucción del cartílago. Sin embargo, a pesar de estos resultados alentadores, un porcentaje significativo de los pacientes no responden a estos agentes, lo que sugiere que también están implicados otros mediadores en la fisiopatología de la artritis (Gabay, Expert. Opin. Biol. Ther. 2(2): 135-149, 2002).

Existen varios modelos animales para la artritis reumatoide conocidos en la técnica. Por ejemplo, en el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC), los ratones desarrollan una artritis inflamatoria crónica que guarda un estrecho parecido con la artritis reumatoide humana. Como la AIC comparte características inmunológicas y patológicas similares con la AR, esto hace que sea un modelo ideal para cribar compuestos antiinflamatorios humanos potenciales. El modelo AIC es un modelo bien conocido en ratones que depende tanto de una respuesta inmune como de una respuesta inflamatoria para tener lugar. La respuesta inmune comprende la interacción de las células B y las células T CD4+ en respuesta al colágeno, que se da como antígeno, y da lugar a la producción de anticuerpos anticolágeno. La fase inflamatoria es el resultado de las respuestas tisulares a partir de mediadores de la inflamación, como consecuencia de que algunos de estos anticuerpos presenten una reacción cruzada con el

colágeno nativo del ratón y activen la cascada del complemento. Una ventaja de utilizar el modelo AIC es que se conocen los mecanismos básicos de la patogenia. Se han identificado los epitopos relevantes de células T y células B sobre el colágeno de tipo II, y se han determinado diversos parámetros inmunológicos (v.g., hipersensibilidad de tipo retardado y anticuerpo anticolágeno) e inflamatorios (v.g., citoquinas, quimioquinas y enzimas degradadoras de la matriz) relacionados con la artritis inmunomediada, y se pueden usar, por lo tanto, para valorar la eficacia de los compuestos de ensayo en el modelo AIC (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 col., Immunol. 92: 8955-959, 1995).

Se utiliza la administración de anticuerpos anti-IL-21 a estos ratones del modelo AIC para evaluar el uso de anticuerpos anti-IL-21 para mejorar los síntomas y alterar el curso de la enfermedad.

Enfermedad inflamatoria del intestino (EII)

En los Estados Unidos, aproximadamente 500.000 personas padecen enfermedad inflamatoria del intestino (EII), que puede afectar o bien al colon y al recto (colitis ulcerativa), o bien tanto al intestino delgado como al grueso (Enfermedad de Crohn). La patogenia de estas enfermedades no está clara, pero conllevan inflamación crónica de los tejidos afectados. La colitis ulcerativa (CU) es una enfermedad inflamatoria del intestino grueso, comúnmente llamado colon, caracterizada por inflamación y ulceración de la mucosa o revestimiento más interno del colon. Esta inflamación hace que el colon se vacíe frecuentemente, lo que da lugar a diarrea. Los síntomas incluyen ablandamiento de las heces y dolor abdominal, fiebre y pérdida de peso asociados. Aunque se desconoce la causa exacta de la CU, la investigación reciente sugiere que las defensas naturales del organismo están actuando contra las proteínas en el organismo que el organismo considera extrañas (una "reacción autoinmune"). Quizá porque se parecen a las proteínas bacterianas en el intestino, estas proteínas pueden instigar o estimular el proceso inflamatorio, que comienza a destruir el revestimiento del colon. A medida que se destruye el revestimiento del colon, se forman úlceras, que liberan moco, pus y sangre. La enfermedad comienza normalmente en el área rectal y puede extenderse eventualmente por todo el intestino grueso. Episodios repetidos de inflamación dan lugar a engrosamiento de la pared del intestino y del recto, con tejido cicatricial. Se puede producir muerte del tejido del colon o sepsis en caso de enfermedad severa. Los síntomas de la colitis ulcerativa varían en cuanto a severidad y su aparición puede ser gradual o súbita. Los ataques pueden ser provocados por muchos factores, incluyendo infecciones respiratorias o estrés.

Aunque actualmente no se dispone de cura para la CU, los tratamientos se centran en la supresión del proceso inflamatorio anormal en el revestimiento del colon. Se dispone de tratamientos que incluyen inmunosupresores corticosteroides (v.g., azatioprina, mercaptopurina y metotrexato) y aminosalicatos para tratar la enfermedad. Sin embargo, el uso a largo plazo de inmunosupresores tales como los corticosteroides y la azatioprina puede dar lugar a efectos colaterales serios, incluyendo adelgazamiento de huesos, cataratas, infección y efectos sobre el hígado y la médula ósea. En los pacientes en los que no son eficaces las terapias actuales, la cirugía constituye una opción. La cirugía conlleva la eliminación de todo el colon y del recto.

Existen varios modelos animales que pueden imitar parcialmente la colitis ulcerativa crónica. El modelo más ampliamente utilizado es el modelo de colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS)/etanol, que induce inflamación crónica y ulceración en el colon. Cuando se introduce TNBS en el colon de ratones susceptibles por instilación intrarrectal, induce una respuesta inmune mediada por células T en la mucosa del colon, lo que en este caso da lugar a una inflamación masiva de la mucosa caracterizada por la densa infiltración de células T y macrófagos por toda la pared del intestino grueso. Más aún, esta imagen histopatológica va acompañada de la imagen clínica de pérdida progresiva de peso (debilitación), diarrea con sangre, prolapso rectal y engrosamiento de la pared del intestino grueso (Neurath y col. Intern. Rev. Immunol. 19: 51-62, 2000).

Otro modelo de colitis utiliza el dextrano sulfato de sodio (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 infiltración de células inflamatorias en la lámina propia, con hiperplasia linfoide, daños focales en las criptas y ulceración epitelial. Se piensa que estos cambios se desarrollan debido a un efecto tóxico del DSS sobre el epitelio y por fagocitosis de las células de la lámina propia y producción de TNF-alfa y IFN-gamma. A pesar de su uso común, varias cuestiones relacionadas con los mecanismos del DSS sobre la relevancia para la enfermedad humana permanecen sin resolver. Se considera el DSS como un modelo independiente de las células T, ya que se observa en animales deficientes en células T, tales como los ratones SCID.

Se puede utilizar la administración de anticuerpos anti-IL-21 a estos modelos de transferencia TNBS, DSS o CD4 para evaluar el uso de antagonistas de IL-21 para mejorar los síntomas y alterar el curso de la enfermedad gastrointestinal. La IL-21 puede desempeñar un papel en la respuesta inflamatoria en la colitis, y la neutralización de la actividad IL-21 por administración de antagonistas de IL-21 es un enfoque terapéutico potencial para la EII.

Psoriasis

La psoriasis es una afección crónica de la piel que afecta a más de siete millones de americanos. La psoriasis

aparece cuando las nuevas células de la piel crecen anormalmente, para dar como resultado zonas de piel inflamadas, hinchadas y escamosas donde la piel vieja no se ha desprendido con suficiente rapidez. La psoriasis en placas, la forma más común, se caracteriza por zonas de piel inflamadas ("lesiones") coronadas con escamas blancas plateadas. La psoriasis puede limitarse a unas cuantas placas o implicar a áreas de piel de moderadas a extensas, apareciendo más comúnmente sobre el cuero cabelludo, las rodillas, los codos y el tronco. Aunque es muy visible, la psoriasis no es una enfermedad contagiosa. La patogenia de la enfermedad incluye inflamación crónica de los tejidos afectados. Los anticuerpos anti-IL-21 de la presente invención podrían servir como agente terapéutico valioso para reducir la inflamación y los efectos patológicos en la psoriasis, en otras enfermedades inflamatorias de la piel, en las alergias de piel y mucosas y en enfermedades relacionadas.

La psoriasis es un trastorno inflamatorio de la piel mediado por células T que puede causar un considerable malestar. Es una enfermedad para la que no existe cura y afecta a personas de todas las edades. La psoriasis afecta aproximadamente a un dos por ciento de las poblaciones de Europa y de Norteamérica. Aunque los individuos con psoriasis leve pueden con frecuencia controlar su enfermedad con agentes tópicos, más de un millón de pacientes en todo el mundo requieren terapia inmunosupresora ultravioleta o sistémica. Desafortunadamente, la inconveniencia y los riesgos de la radiación ultravioleta y las toxicidades de muchas terapias limitan su uso a largo plazo. Más aún, los pacientes tienen normalmente recidivas de la psoriasis, y en algunos casos recuperación, poco después de interrumpir la terapia inmunosupresora. Los anticuerpos anti-IL-21 pueden ser estudiados usando un modelo recientemente desarrollado de psoriasis basado en el modelo de transferencia CD4+CD45RB (Davenport y col., *Internat. Immunopharmacol.*, 2: 653-672, 2002).

Además de otros modelos de enfermedad descritos en el presente documento, se puede medir la actividad de los anticuerpos anti-IL-21 sobre el tejido inflamatorio derivado de lesiones psoriásicas humanas *in vivo* usando un modelo de ratón inmunodeficiente combinado severo (SCID). Se han desarrollado varios modelos de ratón en los que se implantan células humanas en ratones inmunodeficientes (a los que se hace referencia de manera colectiva como modelos de xenoinjerto); véanse, por ejemplo, Cattan AR, Douglas E, *Leuk. Res.* 18: 513-22, 1994, y Flavell, DJ, *Hematological Oncology* 14: 67-82, 1996. Como modelo de xenoinjerto *in vivo* para la psoriasis, se implanta tejido de piel psoriásica humana en el modelo del ratón SCID y se desafía con un antagonista apropiado. Más aún, se pueden usar otros modelos animales de psoriasis de la técnica para evaluar antagonistas de IL-21, tales como injertos de piel psoriásica humana implantados en el modelo del ratón AGR129 y desafiados con un antagonista apropiado (*v.g.*, véase Boyman, O. y col., *J. Exp. Med.* Online publication #20031482, 2004, incorporada en el presente documento como referencia). De forma similar, se pueden usar tejidos o células derivados de colitis, EII, artritis u otras lesiones inflamatorias humanas en el modelo SCID para valorar las propiedades antiinflamatorias de los anticuerpos anti-IL-21 descritos en el presente documento.

La eficacia del tratamiento es medida y estadísticamente evaluada como aumento del efecto antiinflamatorio en la población tratada a lo largo del tiempo usando métodos bien conocidos en la técnica. Algunos métodos ejemplares incluyen, aunque sin limitación, la medición, por ejemplo en un modelo de psoriasis, del grosor epidérmico, del número de células inflamatorias en la dermis superior y de los grados de paraqueratosis. Dichos métodos son conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. Por ejemplo, véanse Zeigler, M. y col., *Lab. Invest.* 81: 1253, 2001; Zollner, T. M. y col., *J. Clin. Invest.* 109: 671, 2002; Yamanaka, N. y col., *Microbiol. 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. También se puede monitorizar la inflamación a lo largo del tiempo usando métodos 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 la EII y puntuación de la enfermedad de la pata y puntuación de la inflamación para el modelo de AR AIC.

Lupus eritematoso sistémico

El lupus eritematoso sistémico (LES) es un trastorno relacionado con inmunocomplejos caracterizado por producción crónica de anticuerpos IgG dirigidos a autoantígenos ubicuos (*v.g.*, anti-ADNdc). Los efectos del LES son sistémicos, en lugar de estar localizados en un órgano específico. Se han asociado con la enfermedad múltiples loci cromosómicos, y éstos pueden contribuir a diferentes aspectos de la enfermedad, tales como anticuerpos anti-ADNdc y glomerulonefritis. Se ha visto que las células T CD4+ tienen una parte activa en modelos murinos de LES (Horwitz, *Lupus* 10: 319-320, 2001; Yellin y Thienel, *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2: 24-37, 2000). El papel de las células T CD8+ no está claramente definido, pero existe evidencia que sugiere que la función de la célula T CD8+ "supresora" está alterada en pacientes con lupus (Filaci y col., *J. Immunol.*, 166: 6452-6457, 2001; Sakane y col., *J. Immunol.*, 137: 3809-3813, 1986).

Se ha visto que la IL-21 modula las respuestas de los anticuerpos actuando directamente sobre las células 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 de LES, existe un elevado nivel en suero de IL-21. Más aún, dado que la IL-21 potencia la actividad de

las células T CD8⁺, la administración de anticuerpos anti-IL-21 proporcionaría una función supresora de las células T más robusta en pacientes con lupus, donde esa función está comprometida.

Se pueden administrar anticuerpos anti-IL-21 en combinación con otros agentes ya en uso en autoinmunidad, incluyendo inmunomoduladores, tales como IFN γ , NOVANTRONE®, ENBREL®, REMICADE®, LEUKINE® e IL-2. El establecimiento del nivel de dosis óptima y de la pauta para anticuerpos anti-IL-21 es realizado por varios medios, incluyendo el estudio de la farmacocinética y la farmacodinámica de los anticuerpos anti-IL-21, la determinación de las dosis efectivas en modelos animales y la evaluación de la toxicidad de los anticuerpos anti-IL-21. Se pueden usar entonces mediciones farmacocinéticas directas realizadas en primates y ensayos clínicos para predecir las dosis teóricas en pacientes que alcanzan niveles plasmáticos de anticuerpos anti-IL-21 que son de magnitud y duración suficientes como para conseguir una respuesta biológica en los pacientes.

La invención es además ilustrada mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1-Preparación de proteínas IL-21

Se produjo proteína IL-21 como se describe en la Publicación de Patente EE.UU. N° 2006-0134754 y en WO 04/055168. Resumiendo, se optimizó una secuencia nucleotídica de IL-21 y se insertó en un vector de expresión de *E. coli*, que fue depositado como N° de Acceso ATCC PTA-4853. Se introdujo el vector de expresión en la cepa W3110 de *E. coli* (N° de Acceso ATCC 27325).

Se fermentaron las células huésped cultivando cepas de *E. coli* que expresaban IL-21 en un medio adecuado en cultivo en matraz con agitación, cuyo medio puede ser suplementado con carbohidratos, tales como fructosa, glucosa, galactosa, lactosa y glicerol. Se puede añadir isopropiltiogalactopiranosido (IPTG) al cultivo hasta una concentración de 0,1 a 2,0 mM.

Después de la fermentación, se recogieron las células por centrifugación, se resuspendieron en tampón de homogenización y se homogenizaron. Después de recoger el homogenado, se resuspendió éste en una solución que contenía guanidina y se decantó y retuvo el sobrenadante que contenía IL-21 solubilizada. Se determinó la concentración de la IL-21 en la fracción solubilizada por HPLC de fase invertida. Una vez solubilizados y desnaturalizados los cuerpos de inclusión en una solución de guanidina que contenía un agente reductor, se oxidó luego la IL-21 reducida en una etapa de renaturalización controlada. Esta etapa conllevaba la dilución en un tampón de dilución que contenía clorhidrato de arginina, sales y un sistema de redistribución de óxido.

La purificación de la proteína IL-21 puede incluir la purificación de la IL-21 usando cromatografía de interacción hidrofóbica. La IL-21 puede ser además purificada por cromatografía de intercambio catiónico de alto rendimiento. Los métodos de purificación de IL-21 pueden comprender la concentración y la realización de 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 intercambiarlo en tampón de formulación. Se concentra el pool final de eluato de la columna para aumentar la concentración de IL-21. Puede ser deseable una mayor purificación de la IL-21 para eliminar el resto de impurezas y de contaminantes. Por ejemplo, se puede usar una columna de intercambio aniónico para reducir el nivel de endotoxinas.

Ejemplo 2-Preparación de proteínas de los receptores de IL-21

Se puede producir la proteína heterodimérica del receptor de IL-21 (también denominado α 11 o IL-21r) como se describe en la Publicación de Patente EE.UU. N° 2002-0137677. Para explicarlo brevemente, se construye un vector que expresa un heterodímero h α 11/hIL2R γ humano segregado. En esta construcción, se fusiona el dominio extracelular de h α 11 con el dominio CH1 de IgG γ 1. Se clona el dominio CH1 en un vector de expresión de mamíferos. Se clona el dominio CL1 de la cadena ligera κ humana en un vector de expresión de mamíferos.

Se prepara una construcción que tiene α 11 humano fusionado a CH1 y se secuencian los vectores para confirmar que la fusión es correcta. También se puede construir una construcción independiente que tenga hIL2R γ humano fusionado a CL1. Se secuencian los vectores resultantes para confirmar que la fusión IL-2R γ humano/CL1 es correcta.

Se coexpresan las fusiones de los receptores α 11 (IL-21r) humano y IL-2R γ humano. Cada vector de expresión es cotransfectado en células huésped de mamífero por métodos conocidos para los expertos en la técnica. Se seleccionan las células transfectadas durante 10 días en metotrexato (MTX) y G418 (Gibco/BRL) durante 10 días. Se selecciona de nuevo el pool resultante de transfectantes en MTX y G418 durante 10 días.

Se usa el pool resultante de células doblemente seleccionadas para generar proteína. Se usan las fábricas (Nunc, Dinamarca) de este pool para generar medio acondicionado. Se pasa este medio acondicionado libre de suero sobre una columna de proteína A y se eluye en fracciones. Se reúnen las fracciones que resultan tener la mayor

concentración y se dializan (corte de PM 10 kD) contra PBS. Finalmente, se envía el material dializado a análisis de aminoácidos (AAA). Se puede usar el receptor $\alpha 11$ /receptor IL-2R γ humano soluble purificado para valorar su capacidad para competir por la unión del ligando $\alpha 11$ humano en un ensayo de proliferación BaF3.

5 B. Se generó el dominio extracelular del $\alpha 11$ humano fusionado a Fc9 (región Fc del $\gamma 1$ 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 marcaje GluGlu (Grussenmeyer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7952-4, 198)) en el extremo carboxilo por PCR de solapamiento. Se insertó el ADNc en pZMP31 (descrito en la solicitud de Patente EE.UU. US2003/023414; un vector híbrido que tiene un potenciador de citomegalovirus y un promotor del virus del sarcoma mieloproliferativo) por recombinación en levaduras. Se fusionó el dominio extracelular de la cadena γ común del receptor IL2 humano con Fc9 con un marcaje 6XHis en el extremo carboxilo de Fc9. Se insertó esta construcción en pZMP21z por recombinación en levaduras usando el mismo método que el descrito para $\alpha 11$ Fc9CEE. Se secuenciaron las construcciones resultantes para verificar que las inserciones eran correctas. Se transfectaron ambos plásmidos en células CHO adaptadas a condiciones libres de suero en suspensión por electroporación y se seleccionaron en medio PFCHO libre de proteínas (BioWhittaker) sin hipoxantina y timidina con adición de 200 ng/ml de zeomicina. Se seleccionaron entonces estas células en el mismo medio más concentraciones crecientes de metotrexato hasta que las células fueron resistentes tanto a metotrexato 1 μ M como a 200 ng/ml de zeomicina. Se estudiaron las células para la producción de receptor de IL-21 heterodimérico por análisis de transferencia Western en cuanto a la presencia de EE y de marcajes his.

10 El diseño de zcytor26f2 (se fusionó el dominio extracelular de la cadena γ común del receptor de IL-2 humano con Fc9 con un marcaje 6XHis) es tal que se dispone de tres marcajes para la purificación (GluGlu, His y Fc), de los cuales se utilizan dos para discriminar mejor el heterodímero de los dos contaminantes homodiméricos. Todas las moléculas que contienen un dominio Fc (contaminantes homodiméricos y diana heterodimérica) fueron capturadas y purificadas con respecto a los componentes de las células huésped y productos del medio relacionados. Se concentró el pool que contenía todas las especies y se inyectó sobre una columna de exclusión por tamaño apropiada (Superdex 200) con objeto de eliminar agregados. Se sometió el pool SEC que contenía las tres especies (dos homodímeros y un heterodímero) a Cromatografía de Afinidad en Metal Inmovilizado (IMAC) usando el contraíón Ni en condiciones de carga y elución altamente discriminantes. El pool de elución IMAC contenía heterodímero muy puro, con una contaminación sólo residual de homodímero. Se intercambié el tampón del pool IMAC por tampón de formulación usando cromatografía de exclusión por tamaño (Superdex 200), que también elimina cualquier producto de agregación residual. Se usó esta proteína heterodimérica IL-21 como comparador al estudiar la actividad neutralizante de un anticuerpo.

35 Ejemplo 3-Preparación de anticuerpos monoclonales para IL-21

Se preparan anticuerpos monoclonales de rata inmunizando a 4 ratas Sprague-Dawley hembras (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) con la proteína IL-21 recombinante purificada. Se da a cada una de las ratas una inyección inicial intraperitoneal (IP) de 25 μ g de la proteína recombinante purificada en Adyuvante Completo de Freund (Pierce, Rockford, IL), seguido de inyecciones IP de refuerzo de 10 μ g de la proteína recombinante purificada en Adyuvante Incompleto de Freund cada dos semanas. Siete días después de la administración de la segunda inyección de refuerzo, se sangra a los animales y se recoge el suero.

45 Se caracterizan las muestras de sueros de las ratas específicas para IL-21 por ELISA usando 1 μ g/ml de la proteína del receptor IL-21 recombinante purificada como la diana específica del anticuerpo. Los ELISA comprenden la preparación del antígeno IL-21, el revestimiento 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 período de tiempo que permita que los anticuerpos de los sueros de las ratas se unan al antígeno. Se añade a los pocillos un segundo anticuerpo de detección (que reconoce los anticuerpos de interés contenidos en los sueros de las ratas) conjugado con un compuesto detectable, tal como un substrato enzimático (*v.g.*, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina). Un experto en la técnica tendrá conocimientos en cuanto a los parámetros que pueden ser modificados para aumentar la señal detectada, así como sobre otras variaciones de los ELISA conocidas en este campo. Para una mayor discusión en cuanto a los ELISA, véase, *v.g.*, Ausubel y col. eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, en 11.2.1.

55 Se recogen esplenocitos de una sola rata que tiene un título elevado y se fusionan con células de mieloma SP2/0 (ratón) usando PEG 1500 en un solo procedimiento de fusión (razón de fusión 4:1, esplenocitos a células de mieloma, "Antibodies: A Laboratory Manual", E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Press). Después de 9 días de crecimiento postfusión, se identifican pooles de hibridomas productores de anticuerpos específicos por ELISA usando 500 ng/ml de la proteína IL-21 recombinante como diana específica para el anticuerpo. Se analizan además los pooles de hibridomas positivos en cuanto a su capacidad para bloquear la actividad proliferativa celular ("ensayo de neutralización") de la proteína IL-21 recombinante purificada sobre células BaF3 que expresan la secuencia del receptor de IL-21.

65 Se clonan los pooles de hibridomas que dan resultados positivos por el "ensayo de neutralización" al menos dos veces por dilución limitante.

Se caracterizan los anticuerpos monoclonales producidos por clones de una serie de formas, incluyendo binning (es decir, determinando si cada anticuerpo podría inhibir la unión de cualquier otra unión), afinidad relativa y neutralización. Se caracterizan los anticuerpos monoclonales purificados a partir del medio de cultivo de tejidos en cuanto a su capacidad para bloquear la actividad proliferativa celular ("ensayo de neutralización") de IL-21 recombinante purificada sobre células Baf3 que expresan las secuencias de los receptores. Los anticuerpos monoclonales "neutralizantes" son identificados de este modo.

Se tomaron muestras de los pools de hibridomas y se estudiaron usando el ensayo de neutralización y un ELISA de titulación directa. En este ensayo, se tituló una muestra usando diluciones seriadas de razón cuatro para ver qué clon podía mantener la lectura de DO más alta. Utilizando los resultados de los ensayos de neutralización y de titulación, se seleccionaron clones específicos de cada pocillo maestro inicial para continuar con ellos. Se realizó otro cribado de neutralización que manejaba todas estas muestras en el mismo ensayo, y en este punto se estrechó el número de líneas celulares a cuatro picos superiores. Se sometieron éstos a una ronda adicional de clonación para asegurar la homogeneidad del cultivo y se cribaron usando el ELISA directo. Después de un ensayo más de titulación, se seleccionaron dos clones de IL-21 finales y se les designó como 268.5.1.11.42.1.4.3.9 (IL-21 de rata antirratón, N° de Acceso ATCC PTA-10394) y 272.21.1.3.4.2 (IL-21 de rata antihumano, N° de Acceso ATCC PTA-10395). Se pueden cultivar los anticuerpos monoclonales producidos por estos clones de hibridomas en un medio de crecimiento de un 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 estreptomycin y un 10 % de Suero de Clon I Fetal (Hyclone Laboratories). Se pueden propagar los clones iniciando cultivos a 2×10^5 células/ml y manteniéndolos a entre 1×10^5 y 5×10^5 células/ml a 37°C y con un 5-6 % de CO₂. Las células pueden adaptarse a condiciones libres de suero tras posteriores transferencias. Las células que se congelan son guardadas en un 90 % de suero y un 10 % de DMSO, y se guardan en la fase de vapor de un congelador de nitrógeno líquido.

Ejemplo 4-Cribado de suero de anticuerpo monoclonales

Se mide la actividad de los anticuerpos anti-IL-21 usando un bioensayo de potencia basado en células. El bioensayo utiliza una línea celular indicadora BaF3 que fue sometida a ingeniería para que expresara el receptor de IL-21 (IL-21 R) por transfección estable con ADNc de IL-21 R. Las células transfectadas IL-21 R/BaF3 son altamente dependientes de rIL-21 o IL-3 para su crecimiento y, en su ausencia, son incapaces de proliferar y de sufrir apoptosis en 24 horas. En el bioensayo basado en células, se incuban las células transfectadas IL-21R/BaF3 con concentraciones variables de suero que contiene anticuerpos anti-IL-21 y se mide la posterior proliferación celular.

Ejemplo 5- Caracterización de anticuerpos

Binning epitópico

Se realizan estudios de binning epitópico en un sistema Biacore1000™ (Biacore, Uppsalla, Suecia). Se programan los métodos usando el Lenguaje de Definición de Métodos (LDM) y se llevan a cabo usando el Biacore Control Software, v 1.2. Se inmoviliza covalentemente anticuerpo Fc de IgG de cabra antirratón policlonal (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) en un chip sensor Biacore CM5 y se usa para unir (capturar) el anticuerpo monoclonal primario de las series de ensayo al chip. Se bloquean entonces los sitios de unión de Fc inocupados sobre el chip usando un fragmento Fc de IgG policlonal (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). A continuación, se inyecta IL-21 y se deja que se una específicamente al anticuerpo monoclonal primario capturado. El instrumento Biacore mide la masa de proteína unida a la superficie del chip sensor y, por lo tanto, se verifica la unión tanto del anticuerpo primario como del antígeno IL-21 para cada ciclo. Tras la unión del anticuerpo primario y del antígeno al chip, se inyecta un anticuerpo monoclonal de la serie de ensayo como anticuerpo secundario y se deja que se una al antígeno preunido. Si el anticuerpo monoclonal secundario es capaz de unirse al antígeno IL-21 simultáneamente al anticuerpo monoclonal primario, se detecta un aumento de masa sobre la superficie del chip, o unión. Si, sin embargo, el anticuerpo monoclonal secundario no es capaz de unirse al antígeno IL-21 simultáneamente al anticuerpo monoclonal primario, no se detecta masa adicional, o unión. Se usa cada anticuerpo monoclonal estudiado contra sí mismo como control negativo para establecer el nivel de la señal de fondo (no unión). Se recopilan los datos usando el programa BioEvaluation 3.2 RC1 y se cargan después en Excel™ para el procesamiento de datos.

Transferencia Western

Se valora la capacidad de los anticuerpos monoclonales neutralizantes procedentes de clones para detectar IL-21 desnaturalizada y reducida/desnaturalizada de dos fuentes usando un formato de transferencia Western. Se usa un anticuerpo policlonal de conejo que se sabe detecta IL-21 en un formato de transferencia Western como control positivo.

Se carga proteína IL-21 en geles NuPAGE Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen, Carlsbad, CA) en tampón de muestras no reductor o reductor (Invitrogen) junto con patrones de peso molecular (SeeBlue; Invitrogen) y se realiza una electroforesis. Tras la electroforesis, se transfiere la proteína desde el gel, se bloquean los blots de nitrocelulosa

durante la noche y se les expone a cada anticuerpo. Se sondean entonces los blots con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante: IgG de oveja antirratón-HRP (Amersham: Piscataway, NJ) para los anticuerpos monoclonales e Ig de burro anticonejo-HRP (Amersham) para los anticuerpos policlonales. Se detecta el anticuerpo unido usando un reactivo quimioluminiscente (Reactivo Lumi-Light Plus: Roche, Mannheim, Alemania) y se registran las imágenes de los blots en un Lumi-Imager (Mannheim- Boehringer).

Ejemplo 6-Modelo de ratón DTH

Las respuestas DTH son respuestas inmunes clásicas que son iniciadas por las células T CD4+ y están mediadas por las células T, los neutrófilos y los macrófagos. Una respuesta DTH es un buen indicador de una respuesta mediada por las células T CD4+. Se inmuniza a ratones subcutáneamente con la proteína ovoalbúmina de pollo (OVA) en cualquiera de dos adyuvantes, RIBI o CFA. Esta fase es denominada la fase de sensibilización (días 0-6). Se toman mediciones en la oreja siete días después. Se inyecta entonces a los ratones en la oreja con PBS control (oreja izquierda) u OVA (oreja derecha). Esta fase es denominada la fase de desafío (días 7-8). Las respuestas inmunes generadas hacia la OVA inducen inflamación en la oreja, lo que da como resultado un aumento en el grosor de la oreja en 24 horas en la oreja tratada con OVA, pero no en la tratada con PBS. Se mide esto utilizando un calibre.

Se inmuniza a ratones C57BL/6 (n=8/grupo) en el dorso con 100 µg de ovoalbúmina de pollo (OVA) emulsionada en adyuvante RIBI (Corixa, Seattle, WA) en un volumen total de 200 µl. Se añaden 0,5 mg/ml de ovoalbúmina a un solo vial de RIBI y se agita en vórtice vigorosamente durante 2 minutos, para formar una emulsión, que se usa para inyectar a los ratones. A los siete días de la inmunización, se inyectan a los ratones 10 µl de PBS en la oreja izquierda (control) y 10 µg de OVA en PBS en la oreja derecha en un volumen de 10 µl. Se mide el grosor de la oreja de todos los ratones antes de inyectar a los ratones en la oreja (medición 0). Se mide el grosor de la oreja a las 24 horas del desafío. Se calcula la diferencia en el grosor de la oreja entre la medición 0 y la medición de las 24 horas, y ésta refleja la inflamación en la oreja. Se inyectan a grupos de ratones PBS o diferentes concentraciones de anticuerpo anti-IL-21 intraperitonealmente desde los días 0-6 (fase de sensibilización) o desde los días 7-8 (fase de desafío). La inyección de los días 7 y 8 es administrada 2 horas antes de medir el grosor de la oreja en los puntos temporales de las 0 y de las 24 horas. Al final del período de 24 horas, una vez medido el grosor de la oreja, se cortan las orejas y se ponen en formalina para el análisis histológico.

Ejemplo 7-Modelo de ratón para la esclerosis múltiple

Para estudiar si anti-IL-21 tiene algún efecto sobre la esclerosis múltiple, se estudia la capacidad de los anticuerpos anti-IL-21 para inhibir la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo de ratón para la EM. Se usa el bien caracterizado modelo de inmunización con la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) péptido 35-55 en ratones C57BL/6. Se realiza el experimento para determinar si el anticuerpo anti-IL-21 podría retrasar y/o inhibir las puntuaciones de la enfermedad en la EAE, ya sea por inhibición de la presentación de antígeno mediada por CD, ya sea por aumento de las respuestas de las células T CD8. La ausencia de repuestas eficientes de las células T CD8 en este modelo exacerba la EAE (Malipiero y col., Eur. J. Immunol., 27: 3151-3160, 1997). El retraso en la aparición de la enfermedad en el modelo EAE de un modo dependiente de dosis sugiere que el uso de anticuerpo anti-IL-21 podría ser beneficioso en la EM.

La encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) es un modelo de ratón para la EM. En uno modelo tal, se inmuniza a ratones C57BL/6 con 100 µg de péptido MOG (MOG35-55) o 100 µg de proteína MOG recombinante emulsionada en adyuvante RIBI. Se añaden 2 ml de una preparación a razón de 0,5 mg/ml del MOG35-55 en PBS a un vial de RIBI y se agita en vórtice vigorosamente para emulsionar la solución, o bien se prepara una razón 1:1 de MOG recombinante en DFA. Se afeitan los dorsos de los ratones y se inyectan 100 µg de MOG/RIBI s.c en los dorsos de los ratones. Se toman los pesos de los ratones 2 días antes y cada día después de la inmunización. Se inyectan entonces a los ratones el día 2 i.v. 200 µl de toxina pertussis (TP), a una concentración final de 200 ng/ratón. Se monitoriza a los ratones diariamente en cuanto a las puntuaciones clínicas. Se inyectan a grupos de ratones i.p. 200 µl de PBS, 100 µg de BSA y 10 µg -200 µg de anticuerpo anti-IL-21 en un volumen de 200 µl desde los días 0-20, o 3x a la semana durante 3 semanas. Se evalúan los pesos de los ratones, las puntuaciones clínicas y la incidencia y se representan para su análisis.

Ejemplo 8-Modelo de ratón de colitis y psoriasis CD4+CD45RBhi (CD25-)

La transferencia de células T CD4+ CD45RBhi o CD4+CD25- a ratones SCID singénicos da lugar a colitis en los ratones. La cotransferencia de células T reguladoras (CD4+CD25+ o CD4+CD45RBlo) inhibe esta colitis. Tras transferencia de células T CD4+CD25- a ratones, si se inyecta adicionalmente a los ratones enterotoxina B estafilocócica (EBE), los ratones no sólo desarrollan colitis, sino también psoriasis. Se administra anticuerpo anti-IL-21 desde los días 0-21 después de la transferencia de las células y se monitorizan los síntomas de colitis y psoriasis. La inhibición de la puntuación psoriásica o de la colitis (histología) indica que el anticuerpo anti-IL-21 puede inhibir estas enfermedades autoinmunes.

Se aíslan los bazo y los ganglios linfáticos inguinales de ratones B10.D2. Se forman suspensiones de una sola célula y se cuentan. Utilizando el sistema Miltenyi Bead, se clasifican las células CD25+ por selección positiva. Se tiñen las células con CD25-PE (BD Pharmingen) a una dilución 1:100 y se incuban durante 15 minutos. Se lava el exceso de anticuerpo y se incuban las células con 10 μ l de perlas anti-PE/ 10^6 células durante 20 minutos. Se lavan las células con PBS y se pasan sobre una columna LS (Miltenyi Biotech). Las células que pasan a través de la columna (CD25-) son retenidas para posterior análisis. Se añade un cóctel de enriquecimiento 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 antibiotina a las células durante 15 minutos, seguido de un coloide magnético (60 μ l/ 10^6 células) durante 15 minutos (todos 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 su través son las células CD4+CD25-. Se analiza la pureza usando citometría de flujo. Se inyectan $0,4 \times 10^6$ células i.v. a ratones SCID CB-17 naif en un volumen total de 200 μ l. Se inyectan a los ratones i.p. 10 μ g de EBE al día siguiente (d1). Se hace un seguimiento de los síntomas de psoriasis y de colitis desde las 2-5 semanas. Se inyectan a grupos de ratones i.p. PBS, 100 μ g de BSA o 10-200 μ g de IL-21 desde los días 1-20, o 3x a la semana durante 3 semanas.

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

Ejemplo 9-Modelo de ratón de hipersensibilidad de contacto

Se puede inducir hipersensibilidad de contacto en ratones usando varios alérgenos de contacto, incluyendo dinitrofluorobenceno (DNFB) y oxazolona. Los ratones son sensibilizados tópicamente con el alérgeno en un vehículo de acetona y aceite de oliva y luego inoculados en la oreja con el alérgeno en aceite de oliva solo. El cambio en el grosor de la oreja es una medida de la respuesta inmune contra el alérgeno. Se administran anticuerpos anti-IL-21 en la fase de sensibilización (d0-5) o durante la fase de desafío (d5-6). La inhibición del grosor de la oreja por IL-21 indica un papel para IL-21 en la inhibición de la hipersensibilidad de contacto.

Se pinta a ratones C57B1/6 en el dorso con DNFB al 0,5 % en acetona:aceite de oliva (4:1) o acetona:aceite de oliva sólo el d0. El d5, se mide el grosor de la oreja de los ratones usando un calibre y se inocula a los ratones en las orejas con aceite de oliva solo (control) o con DNFB al 0,25 % en aceite de oliva dejando caer 25 μ l de solución sobre la oreja. Se mide el cambio en el grosor de la oreja el d6 y se calcula la inflamación como la diferencia en el grosor de la oreja entre el d5 y el d6. Se inyectan a grupos de ratones i.p. PBS o 10-100 μ g de anticuerpos anti-IL-21 los días 0-5 o los días 5-6.

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

Se recogen y reúnen esplenocitos de dos ratones Balb/c de elevado título y se fusionan con células de mieloma de ratón P3-X63-Ag8.653 usando PEG 1450 en un solo procedimiento de fusión (razón de fusión 2:1, esplenocitos a células de mieloma, "Antibodies: A Laboratory Manual", E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Press). Después de 9 días de crecimiento posfusión, se identifican los pools de hibridomas productores de anticuerpos específicos por ELISA Directo y de Captura usando proteína IL-21 recombinante, sin marcar y marcada con Fc de IgG humana, como diana específica para el anticuerpo. Se analizan los pools de hibridomas positivos además en cuanto a su capacidad para bloquear la actividad proliferativa celular ("ensayo de neutralización") de la proteína IL-21 recombinante purificada en células BaF3 que expresan la secuencia del receptor de IL-21. Se caracterizan los anticuerpos monoclonales purificados a partir del medio de cultivo de tejidos en cuanto a su capacidad para bloquear la actividad proliferativa celular ("ensayo de neutralización") de la IL-21 recombinante purificada en células BaF3 que expresan las secuencias de los receptores. Se identifican anticuerpos monoclonales "neutralizantes" de este modo.

Se clonan los pools de hibridomas que dan resultados positivos mediante los formatos del "ensayo de neutralización" y de ELISA al menos dos veces por dilución limitante. En estos ensayos, se titulan las muestras usando diluciones seriadas de razón cuatro para ver qué clon mantendrá la lectura de DO más alta. Usando los resultados de los ensayos de neutralización y de titulación, se seleccionan dos clones específicos de cada pocillo maestro inicial para posterior análisis. Se someten éstos a una ronda adicional de clonación para asegurar la homogeneidad del cultivo y se criban usando el ELISA Directo. Después de un ensayo de titulación adicional, se seleccionan dos clones IL-21 finales. Se cultivan los clones de hibridoma en un medio de crecimiento de un 90 % de medio de Dulbecco Modificado de Iscove con 2 mM de L-glutamina, 100 μ g/ml de penicilina y 100 μ g/ml de sulfato de estreptomycin y un 10 % de Suero Clon I Fetal (Hyclone Laboratories). Se propagan los clones sembrando cultivos a razón de 2×10^5 células/ml y manteniéndolos a entre 1×10^5 y 5×10^5 células/ml a 37°C y con un 5-6 % de CO₂. Se adaptan las células a condiciones libres de suero tras transferencias sucesivas. Se congelan las células en un 90 % de suero y un 10 % de DMSO y se guardan en la fase de vapor de un congelador de nitrógeno líquido.

Se caracterizan los anticuerpos monoclonales purificados producidos por los clones de hibridoma de una serie de formas, incluyendo binning (es decir, determinación de si cada anticuerpo podría inhibir la unión de cualquier otra unión), mapeo de epitopos usando péptidos, afinidad relativa y neutralización.

Ejemplo 11-Selección de secuencias peptídicas para uso en la evaluación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la IL-21 humana

5 Se realizó una valoración de la unión de anticuerpos murinos anti-IL-21 humana a los diversos dominios de IL-21 en parte a través de la capacidad de los anticuerpos monoclonales para unirse a péptidos sintéticos derivados de la secuencia de la IL-21 humana nativa. Se seleccionaron péptidos de 18-29 aminoácidos para proporcionar un cubrimiento significativo del polipéptido citoquina, poniendo la atención en dominios que se predice a partir de estudios de la citoquina muteína y de la estructura de citoquinas relacionadas con la IL-21 que son importantes en la
10 unión o activación de receptores. Los péptidos que se encuentran en este rango de tamaños son también eficaces en cuanto a su fabricación y son de un tamaño que puede proporcionar una estructura secundaria limitada para el reconocimiento por el anticuerpo. Se sintetizaron los péptidos 1, 3 y 4 con un extremo carboxilo amidado para imitar mejor la carga electrostática encontrada en los enlaces peptídicos nativos.

15 Péptido #1

Se eligió el extremo N de la IL-21 humana después del procesamiento en mamíferos de la secuencia del péptido señal, junto con la secuencia de aminoácidos adyacente de IL-21 (Nº ID. SEC.: 6), para un péptido. La expresión en mamíferos de la IL-21 humana y la secuenciación N-terminal de la citoquina habían demostrado previamente que,
20 tras la escisión del péptido señal, el aminoácido N-terminal resultante era el derivado piroglutamato de la glutamina-30. Se escogió este derivado para el aminoácido N-terminal del péptido, junto con los siguientes 20 aminoácidos encontrados en el extremo amino de la IL-21 humana. Para permitir la copulación eficaz y específica del péptido a las proteínas de vehículo o a la matriz de fase sólida, necesaria para el análisis con este péptido, se añadió un residuo adicional de cisteína al extremo carboxilo del péptido. La secuencia completa del péptido es
25 piroGQDRHMIRMRLIDIVDQLKCamida (Nº ID. SEC.: 1).

Péptido #2

30 Se eligió el segundo péptido debido a su carácter hidrofílico, a la presencia de residuos de prolina (segmento no helicoidal predicho) y a su localización en la secuencia de IL-21 entre las regiones A- y B-helicoidales predichas. Se seleccionó el extremo carboxi-terminal del péptido debido a la presencia de un residuo de cisteína en la secuencia del polipéptido IL-21 humano. La secuencia peptídica es NDLVPEFLPAPEDVETNC (Nº ID. SEC.: 2).

35 Péptido #3

Se seleccionó esta secuencia peptídica por su localización predicha, que comprende una porción significativa de la hélice C hidrofílica de la estructura de IL-21. Se predice que esta región muy hidrofílica es importante en la interacción ligando-receptor, y también se seleccionó la envergadura del péptido para permitir la inclusión de un residuo de cisteína nativo (Cys-122), para permitir conjugaciones eficaces cuando sea apropiado, como se ha
40 indicado anteriormente. La secuencia del péptido es NVSIKLLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCamida (Nº ID. SEC.: 3).

Péptido #4

45 Se seleccionó este péptido debido a su localización cerca del extremo carboxilo de la citoquina y porque estudios que utilizan muteínas de IL-21 han demostrado que esta región peptídica es importante para la activación ligando-receptor, pero no para la unión a ligando. Las mutaciones de Gln-145 y/o Ile-148 contenidas en la secuencia de este péptido han mostrado afectar a la activación del receptor de IL-21 humano. Se inició el péptido de 29 aminoácidos en la Cys-125 nativa para permitir su uso en la copulación química del péptido, como se ha indicado anteriormente, y para que acabara en la Ser-153. Esta serina es el aminoácido final en la IL-21 murina, por lo que se predice que el
50 extremo amino de este residuo de la secuencia peptídica contiene los elementos de la secuencia de la IL-21 humana que son importantes para la actividad del ligando. La secuencia del péptido es CDSYEKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSamida (Nº ID. SEC.: 4).

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

55 Se usaron transfectantes Baf3/receptor IL21 humano (hIL-21R) previamente derivados (véanse las Patentes EE.UU. 6.307.024 y 6.686.178, incorporadas en el presente documento como referencia). Se lavaron las células tres veces en medio de bioensayo Baf3, que consiste en: RPMI, 1X Glutamax, 10 % de suero bovino fetal, 50 uM de beta-mercaptoetanol, 200 ug/ml de zeocina y 1 mg/ml de G418 (todos de Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Después
60 del tercer lavado, se hizo un recuento de las células usando métodos estándar (hemacitómetro) y se resuspendieron a 6×10^5 células por ml en medio de bioensayo. Se plaquearon entonces las células en una placa de cultivo de tejidos de fondo redondo de 96 pocillos a razón de 30.000 células por pocillo. Se transfirió luego la placa a una incubadora de cultivo de tejidos a 37 °C mientras se montaban las otras placas de ensayo.

65 Se montó entonces la placa de muestra con 30 ul de 2,0 ng/ml de IL-21 humana más 30 ul de uno de los siguientes: suero de ratón diluido (concentraciones finales 1:10, 1:50 o 1:100), medio, anticuerpo neutralizante anti-IL-21

(diversos lotes y concentraciones), hIL-21R soluble (ejemplo 2) o controles irrelevantes. Se transfirió luego la placa a una incubadora a 37°C. Después de 30-40 minutos, se retiraron de la incubadora tanto la placa de células como las placas de muestra y se transfirieron 50 ul de cada pocillo en la placa de muestra a la placa de células y se mezclaron. Se pusieron entonces de nuevo las placas en la incubadora a 37°C durante exactamente 8 minutos. En este punto, se detuvo la reacción poniendo la placa sobre hielo y añadiendo 150 ul de tampón de lavado de células BioPlex helado (BioRad Laboratories, Hercules, CA). Se centrifugó la placa durante 5 minutos a 1.500 RPM y 4°C. Tras la centrifugación, se desechó el sobrenadante en la pila y se lisaron las células en 60 ul de tampón de lisis de células BioPlex que contenía Factor 1, Factor 2 y PMSF (todos de BioRad). Se pipetearon las células lisadas para romper los grumos y se agitaron después a 600 RPM a 4°C durante 20 minutos. Se centrifugó luego la placa de nuevo durante 20 minutos a 3.000 RPM y a 4°C. Tras la centrifugación, se retiraron 55 ul de lisado y se mezclaron con 55 ul de tampón de ensayo de fosfoproteína (BioRad).

En este punto, se prehumedeció una placa de filtro con 50 ul de tampón de lavado de fosfoproteína (PWB), se aspiró y se plaquearon 50 ul de perlas copuladas con PhosphoSTAT3 (BioRad). Se aspiraron entonces estas perlas y se lavó la placa tres veces con 75 ul de PWB. Tras la aspiración final, se transfirieron 50 ul de lisado diluido a la placa, que se cubrió entonces y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. A la mañana siguiente, se lavó la placa tres veces con PWB y se añadieron luego anticuerpos de detección PhosphoSTAT3 biotinilado (BioRad) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavó la placa tres veces más en PWB y se añadió luego estreptavidina-PE durante 10 minutos. Finalmente, se lavó la placa tres veces con tampón de resuspensión de fosfoproteína (PRB) y se resuspendieron las perlas en 125 ul de PRB.

Se midió el STAT3 fosforilado total en cada pocillo siguiendo el protocolo de recogida de datos Luminex 100 estándar según las recomendaciones del fabricante (Luminex Inc., Austin, TX). Se analizaron después los datos y se expresaron como múltiplo de inducción de STAT3 fosforilado en comparación con el medio solo.

Se estudió el suero de ratones inmunizados con diversos péptidos IL-21 (véase la tabla 1) en cuanto a la neutralización de la fosforilación de STAT3 inducida por IL-21. Se premezcló IL-21 con una dilución de suero durante 30 minutos a 37°C. Es añadió entonces esta solución a transfectantes Baf3/hIL21R durante 8 minutos. Se detuvo entonces la reacción, se lisaron las células y se midió el STAT3 fosforilado. Se calcula el número de veces de aumento en el STAT3 fosforilado usando el control de "medio solo" como valor basal. Números más bajos guardan correlación con una neutralización más potente de IL-21. En la siguiente Tabla 2 se resumen los datos.

Resumiendo: uno de tres ratones (#1976) inmunizados con péptido #1 y dos de tres ratones (#1979, 1980) inmunizados con péptido #2 generaron anticuerpos neutralizantes de IL-21. Ningún ratón inmunizado con los péptidos #3 y #4 generó anticuerpos neutralizantes. La neutralización observada en la columna de dilución 1:10 puede ser debida a un efecto del suero, no a una actividad anti-IL-21 específica (véanse los datos de "suero irrelevante").

Tabla 1

Péptidos IL-21 y números de muestras de suero correspondientes	
Muestra #	Péptido #
1976-1978	Péptido #1 (véase el ejemplo 11)
1979-1981	Péptido #2 (véase el ejemplo 11)
1982-1984	Péptido #4 (véase el ejemplo 11)
1985-1987	Péptido #3 (véase el ejemplo 11)
1988-1990	Péptido #3 (véase el ejemplo 11)

Tabla 2

Número medio de veces de aumento en los niveles de STAT3 fosforilado en comparación con el medio			
Muestra #	Dilución del suero		
	1:10	1:50	1:100
1976	1,89	5,07	5,15
1977	4,98	10,14	8,63
1978	6,72	8,33	12,99
1979	1,04	1,81	2,17
1980	0,65	1,4	1,81
1981	6,91	9,8	17,06
1982	4,04	10,8	12,73
1983	9,68	12,05	12,42

1984	5,84	10,84	11,78
1985	6,94	12,64	11,5
1986	9,01	13,41	16,61
1987	8,48	14,11	17,36
1988	4,56	8,66	9,38
1989	4,88	11,63	12,66
1990	9,56	10,29	14,58
Controles			
Medio solo	1		
IL-21	12,4		
NMS	11,28	11,72	10,31
Suero irrelevante	3,52	11,09	9,49

Ejemplo 13

Descripción del ensayo del EIA directo

5 Se valoró la capacidad de los péptidos IL-21 humanos (ejemplo 11) para unirse a anticuerpos anti-IL-21 humana usando un ensayo ELISA de estilo "directo". En este ensayo, se revistieron primeramente los pocillos de placas de ELISA de poliestireno de 96 pocillos con 100 µl/pocillo de proteína IL-21 humana a una concentración de 1 µg/ml en tampón de revestimiento (Na₂CO₃ 0,1 M, pH 9,6). Se incubaron las placas durante la noche a 4 °C, después de lo cual se aspiraron los péptidos no unidos y se lavaron las placas dos veces con 300 µl/pocillo de tampón de lavado (PBS-Tween definido como NaCl 0,137 M, KCl 0,0022 M, Na₂HPO₄ 0,0067 M, KH₂PO₄ 0,0020 M, 0,05 % v/p de polisorbato 20, pH 7,2). Se bloquearon los pocillos con 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo (PBS-Tween más un 1 % p/v de seroalbúmina bovina (BSA)) durante 1 hora, después de lo cual se lavaron las placas dos veces con tampón de lavado. Se prepararon diluciones de anticuerpos en medio 5 % FBS/IMDM y se ajustó a 1 µg/ml. Se transfirieron entonces muestras por duplicado de cada dilución de anticuerpo a las placas de ensayo, a 100 µl/pocillo, con objeto de unir los péptidos anti-IL-21 humana. Después de 1 hora de incubación a TA, se aspiraron los pocillos y se lavaron las placas dos veces como se ha descrito anteriormente. Se añadió luego IgG de cabra antirratón marcada con peroxidasa de rábano picante, específica de Fc (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), a una dilución de 1:5000 con un 5 % de medio IMDM a cada pocillo, a 100 µl/pocillo, y se incubaron las placas a TA durante 1 hora. Tras la eliminación del anticuerpo conjugado con HRP no unido, se lavaron las placas cinco veces, se añadieron 100 µl/pocillo de tetrametilbencidina (TMB) (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) a cada pocillo y se incubaron las placas durante 3 minutos a TA. Se detuvo el desarrollo de color por adición de 100 µl/pocillo de reactivo de parada TMB 450 nm (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y se leyeron los valores de absorbancia de los pocillos en un instrumento Spectra MAX 340 de Molecular Devices a 450 nm.

Ejemplo 14

Caracterización de anticuerpos neutralizantes

30 La caracterización de muestras derivadas de sobrenadante de cultivo de hibridomas incluía ensayos de unión usando una proteína de fusión IL-21 humana-Fc, una proteína de fusión IL-21 murina-Fc, una proteína IL-21 humana mutada en Gln 145 e Ile148 (Nº ID. SEC.: 6) y los péptidos antes descritos. Se divulgan fusiones IL-21-Fc en las Patentes EE.UU. Nº 6.307.024 y 6.686.178, y se divulgan métodos para generar fusiones de Fc en las Patentes EE.UU. Nº 5.155.027 y 5.567.584. Se describe la proteína mutante IL-21 en la Patente EE.UU. 6.929.932 y en la Solicitud de Patente EE.UU. Nº 2005-0244930.

Tabla 3

Designación	Isótopo	Neutralización	Se une a hIL-21-proteína Fc	Se une a la muteína de hIL-21	Se une a mIL-21-proteína mFc	Se une al péptido número
Ab 338.17 de ratón	IgG1	Sí	Sí	Sí	Sí	Nº 3
Ab 338.24 de ratón	IgG1	Sí	Sí	Sí	Sí	Nº 3
Ab 338.25 de ratón	IgG1	Sí	Sí	No	Sí	Ninguno
Ab 338.29 de ratón	IgG1	Sí	Sí	Sí	Sí	Nº 1

Ab 272.21.1.3.4.2 de rata	IgG2a	Sí	No	Sí	Sí	Nº 1
---------------------------------	-------	----	----	----	----	------

Ab 338.17 de ratón. Esta muestra se unía a la estructura de la proteína IL-21 humana en un área que se predice se encuentra en la región de la hélice C basándose en su capacidad para unirse al Péptido #3.

5 Ab 338.24 de ratón. Esta muestra se unía a la estructura de la proteína IL-21 humana en un área que se predice se encuentra en la región de la hélice C basándose en su capacidad para unirse al Péptido #3.

10 Ab 338.25 de ratón. Esta muestra se unía al lado de la hélice D de la molécula cerca de Q145 y/o I148 (Nº ID. SEC.: 6) basándose en su capacidad para unirse a la hIL-21 nativa, pero no a la muteína de hIL-21. Es probable que la unión sea con un epitopo discontinuo basándose en su incapacidad para unirse al péptido #4, que contiene la secuencia peptídica nativa mutada en la muteína de IL-21, o el epitopo puede requerir la presencia de Ser154-Ser162 de la secuencia de la IL-21 humana (Nº ID. SEC.: 6).

15 Ab 338.29 de ratón. Esta muestra se unía a la estructura de la proteína IL-21 humana en un área que se predice se encuentra en la región de la hélice A basándose en su capacidad para unirse al Péptido #1. Basándose en su capacidad para reaccionar moderadamente con un Péptido #1 conjugado en el extremo C, pero para reaccionar muy potentemente con el péptido no conjugado, se podría predecir que el epitopo para este anticuerpo incluye el dominio central o C-terminal de la hélice A como se representa en el Péptido #1

20 Ab 272.21.1.3.4.2 de rata. Basándose en su capacidad para reaccionar débilmente con el Péptido #1 tanto conjugado en el extremo C como no conjugado, su capacidad para neutralizar a hIL-21, pero su incapacidad para capturar hIL-21-Fc de la solución, este anticuerpo se une a un epitopo mayormente discontinuo sobre la estructura de la proteína IL-21 humana, que comprende un área que se predice se encuentra en la región del extremo N de IL-21 y la hélice A y requiere espacio cerca del extremo C adyacente de hIL-21, donde se une a la proteína de fusión Fc.

CLÁUSULAS

30 1. Un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 que se une a una región antigénica de la IL-21 humana.

2. El anticuerpo monoclonal anti-IL-21 de la cláusula 1, donde la región antigénica de la IL-21 humana es mostrada en el Nº ID. SEC.: 6 desde los residuos de aminoácidos 97-122.

35 3. El anticuerpo monoclonal anti-IL-21 de la cláusula 2, donde el anticuerpo neutraliza la actividad de una proteína IL-21 humana, se une a una IL-21 humana-proteína Fc, se une a una muteína de IL-21 humana-proteína Fc y se une a una IL-21 murina-proteína Fc murina.

40 4. El anticuerpo monoclonal anti-IL-21 de la cláusula 1, donde la región antigénica de la IL-21 humana es mostrada en el Nº ID. SEC.: 6 desde los residuos de aminoácidos 145 a 148.

5. El anticuerpo monoclonal anti-IL-21 de la cláusula 4, donde el anticuerpo también se une a la región antigénica mostrada en el Nº ID. SEC.: 6 desde los residuos de aminoácidos 154 a 162.

45 6. El anticuerpo monoclonal anti-IL-21 de la cláusula 4, donde el anticuerpo neutraliza la actividad de una proteína IL-21 humana, se une a una IL-21 humana-proteína Fc, no se une a una muteína de IL-21 humana-proteína Fc y se une a una IL-21 murina-proteína Fc murina.

50 7. El anticuerpo monoclonal anti-IL-21 de la cláusula 1, donde la región antigénica de la IL-21 humana es mostrada en el Nº ID. SEC.: 6 desde los residuos de aminoácidos 30 a 50.

8. El anticuerpo monoclonal anti-IL-21 de la cláusula 7, donde el anticuerpo neutraliza la actividad de una proteína IL-21 humana, se une a una IL-21 humana-proteína Fc, se une a una muteína de IL-21 humana-proteína Fc y se une a una IL-21 murina-proteína Fc murina.

55 9. El anticuerpo monoclonal anti-IL-21 de la cláusula 1, donde la región antigénica de la IL-21 humana es mostrada en el Nº ID. SEC.: 6 desde los residuos de aminoácidos 40 a 50.

60 10. El anticuerpo monoclonal anti-IL-21 de la cláusula 9, donde el anticuerpo neutraliza la actividad de una proteína IL-21 humana, se une a una IL-21 humana-proteína Fc, se une a una muteína de IL-21 humana-proteína Fc y se une a una IL-21 murina-proteína Fc murina.

11. Un bin que es capaz de competir con el anticuerpo monoclonal 272.21.1.13.4.2 (Nº de Acceso ATCC PTA-7142) por la unión a un antígeno IL-21 humano.

12. Un bin que es capaz de competir con el anticuerpo monoclonal 268.5.1.11.42.1.4.3.9 (Nº de Acceso ATCC PTA-7143) por la unión a un antígeno IL-21 humano.
- 5 13. El anticuerpo monoclonal de la cláusula 11, donde el anticuerpo monoclonal se une específicamente al epitopo al que se une el anticuerpo monoclonal 272.21.1.13.4.2 (Nº de Acceso ATCC PTA-7142).
14. El anticuerpo monoclonal de la cláusula 11, donde el anticuerpo monoclonal se une específicamente al epitopo al que se une el anticuerpo monoclonal 268.5.1.11.42.1.4.3.9 (Nº de Acceso ATCC PTA-7143).
- 10 15. El anticuerpo monoclonal según las cláusulas 1, 2, 4, 7, 9, 13 o 14 marcado con un marcador detectable.
16. El anticuerpo monoclonal según las cláusulas 1, 2, 4, 7, 9, 13 o 14 marcado con un marcador detectable seleccionado entre el grupo consistente en un isótopo radiactivo, una enzima, un tinte y biotina.
- 15 17. Una célula de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal según las cláusulas 1, 2, 4, 7, 9, 13 o 14.
18. La célula de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la cláusula 17.
- 20 19. Un método de producción del anticuerpo monoclonal según las cláusulas 1, 2, 4, 7, 9, 13 o 14, que comprende: (a) proporcionar un hibridoma capaz de producir el anticuerpo monoclonal y (b) cultivar el hibridoma en condiciones que permitan la producción del anticuerpo monoclonal por el hibridoma.
- 25 20. Un método de tratamiento de una enfermedad autoinmune, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 según las reivindicaciones 1, 2, 4, 7, 9, 13 o 14 a un paciente.
- 30 21. El método de la cláusula 20, donde la enfermedad autoinmune es seleccionada entre el grupo consistente en pancreatitis, diabetes de tipo I (DMID), enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino irritable, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diverticulosis, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, espondilitis anquilosante, esclerodermia, esclerosis sistémica, artritis psoriásica, osteoartritis, dermatitis atópica, vitíligo, enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), linfoma cutáneo de células T (LCCT), síndrome de Sjogren, glomerulonefritis, nefropatía por IgA, enfermedad del injerto contra el huésped, rechazo de trasplantes, dermatitis atópica, síndrome antifosfolípídico y asma, y otras enfermedades autoinmunes.
- 35

Lista de secuencias

- 40 <110> ZymoGenetics, Inc.
- <120> ANTAGONISTAS DE IL-21
- <130> P32025ep-d1-pct
- 45 <140> EP06850198.0
<141> 28-11-2006
- <150> US 60/740.154
<151> 28-11-2005
- 50 <160> 8
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 55 <210> 1
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 60 <220>
<223> péptido sintetizado
- <220>
65 <221> VARIANTE
<222> (1)...(1)
<223> Xaa = pyroGlu

ES 2 491 118 T3

5 <210> 5
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (47)...(532)
 <400> 5

```

gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtactt atg aga tcc 55
                Met Arg Ser
                1

agt cct ggc aac atg gag agg att gtc atc tgt ctg atg gtc atc ttc 103
Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met Val Ile Phe
    5                10                15

ttg ggg aca ctg gtc cac aaa tca agc tcc caa ggt caa gat cgc cac 151
Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln Asp Arg His
    20                25                30                35

atg att aga atg cgt caa ctt ata gat att gtt gat cag ctg aaa aat 199
Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln Leu Lys Asn
                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 taaagaata 642
  
```

15 <210> 6

ES 2 491 118 T3

<211> 162
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 6

```

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
    
```

10 <210> 7
 <211> 3072
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (54) ... (491)

<400> 7

20 gagaaccaga ccaaggecct 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 tgc 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 aggacccgaa gattcctgag gatccgagaa gattcccag 541
 Ser

gactgaggag acgccggaca ctatagacgc tcacgaatgc aggagtacat cttgcctctt 601
 gggattgcaa gtggagaagt acgatacgtt atgataagaa caactcagaa aagctatagg 661
 ttaagatcct ttgcgccatt aactaagcag acattgtggt tccctgcaca gactccatgc 721
 tgtcaacatg gaaaatctca actcaacaag agcccagctt cccgtgtcag ggatttctgg 781
 tgcttctcaa gctgtggctt catcttattg cccaactgtg acattctttg attggaagg 841
 gaaaactaaa gcttttagca aaaatacagc tagggaattt gtcgatctgc gagagtaaga 901
 cctcttatga tcctaacgga atgatgtaag ctggaataa taagcataag atgaaattga 961
 aaattgaagt ctttattctt taagaaaaac tttgtacttg aaagcatgtc tgaagagttt 1021
 actcattacc acaaacatct agcatattga taactaacat ctttatactc tacaagagag 1081
 gctttccaga taggtacagt ttttcttctc tattaggtct atcaaaaattt aacctattat 1141
 gaggtcacc cctggcttcc actgttttcc taaagaggca aggggtgtagt aagaagcagg 1201
 cttaagttgc ctctctccca atgtcaagtt cctttataag ctaatagttt aatcttgtga 1261
 agatggcaat gaaagcctgt ggaagtgcaa acctcaactat cttotggagc caagtagaat 1321
 tttcaagttt gtagctctca cctcaagtgg ttatgggtgt cctgtgatga atctgctagc 1381
 tccagcctca gtctcctctc ccacatcctt tcctttcttt cctctttgaa acttctaaga 1441
 aaaagcaatc caaacaagtt cagcacttaa gacacattgc atgcacactt ttgataagtt 1501
 aaatccaacc atctatttaa aatcaaaatc aggagatgag ccaagagacc agaggttctg 1561
 ttccagtttt aaacagactt ttactgaaca tcccaatctt ttaaccacag aggtctaaatt 1621
 gagcaaatag ttttgccatt tgatataatt tccaacagta tgtttcaatg tcaagttaaa 1681
 aagtctacaa agctattttc cctggagtgg tatcatcgct ttgagaattt cttatggtta 1741
 aatggatct gagatccaag catggcctgg gggatggttt tgatctaagg aaaaaggtgt 1801
 ctgtacctca cagtgccttt aaaacaagca gagatcccgt gtaccgccct aagatagcac 1861
 agactagtgt taactgattc ccagaaaagt gtcacaatca gaaccaacgc atttctcttaa 1921

```

actttaaaaa tatgtattgc aaagaacttg tgtaactgta aatgtgtgac tgttgatgac 1981
attatacaca catagcccac gtaagtgtcc aatgggtgcta gcattgggtg ctgagtttgc 2041
tgctcgaaag ctgaagcaga gatgcagtcc ttcacaaagc aatgatggac agagagggga 2101
gtctccatgt tttattcttt tgttgtttct ggctgtgtaa ctgttgactt cttgacattg 2161
tgatttttat atttaagaca atgtatttat tttgggtgtg ttattgttct agccttttaa 2221
atcactgaca atttctaadc aagaagtaca aataattcaa tgcagcacag gctaagagct 2281
tgtatcgttt ggaaaagcca gtgaaggctt ctccactagc catgggaaag ctacgcttta 2341
gagtaaaacta gacaaaattg cacagcagtc ttgaacctct ctgtgctcaa gactcagcca 2401
gtcctttgac attattgttc actgtgggtg ggaacacatt ggacctgaca cactgttgtg 2461
tgtccatgaa ggttgccact ggtgtaagct ttttttgggtt ttcattctct tatctgtaga 2521
acaagaatgt ggggctttcc taagtctatt ctgtatttta ttctgaactt cgtatgtctg 2581
agttttaatg ttttgagtac tcttacagga acacctgacc acacttttga gttaaatfff 2641
atcccaagtg tgatatttag ttgttcaaaa agggaaggga tatacatata tacatacata 2701
catacatata tatatatata tatatatata tatatatata tatatatatg tatatatata 2761
tatatataga gagagagaga gagagagaga gagaaagaga gagaggttgt tgtaggatcat 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
cccagtccg a 3072

```

<210> 8
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 8

```

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

```

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado que es capaz de competir con el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado en la ATCC bajo el N° de Acceso PTA-10395 por la unión a un antígeno IL-21 humano, donde dicho anticuerpo aislado es un anticuerpo monoclonal que se une a un epitopo antigénico de la IL-21 humana, como se muestra en el N° ID. SEC.: 6 desde los aminoácidos 30-50 (N° ID. SEC.: 1), y donde el anticuerpo se une a la IL-21 humana con una afinidad de unión de $10^7 M^{-1}$ o mayor.
- 10 2. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un epitopo antigénico de la IL-21 humana, donde dicho epitopo antigénico se muestra en el N° ID. SEC.: 6 desde los aminoácidos 30-50 (N° ID. SEC.: 1), donde el anticuerpo se une a la IL-21 humana con una afinidad de unión de $10^7 M^{-1}$ o mayor.
- 15 3. El anticuerpo de las Reivindicaciones 1 o 2, donde el anticuerpo se une específicamente a hIL-21 con una afinidad de unión de $10^9 M^{-1}$ o mayor.
4. El anticuerpo de cualquier reivindicación anterior, donde el anticuerpo neutraliza la actividad de la IL-21 humana.
5. El anticuerpo de la Reivindicación 4, donde el anticuerpo es humano o humanizado.
- 20 6. El anticuerpo de cualquier reivindicación anterior, donde el anticuerpo está marcado con un marcador detectable, tal como un isótopo radiactivo, una enzima, un tinte o biotina.
7. Una célula de hibridoma que produce un anticuerpo según cualquier reivindicación anterior.
- 25 8. Un método de producción del anticuerpo de cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, que comprende:
 - (a) proporcionar un hibridoma capaz de producir el anticuerpo y
 - (b) cultivar el hibridoma en condiciones que permitan la producción del anticuerpo por el hibridoma.
- 30 9. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las Reivindicaciones 1-6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 10. Un anticuerpo anti-IL-21 según cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, o una composición farmacéutica según la Reivindicación 9, para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune.
- 40 11. Un anticuerpo anti-IL-21 o una composición farmacéutica para uso según la Reivindicación 10, donde la enfermedad autoinmune es seleccionada entre el grupo consistente en pancreatitis, diabetes de tipo I (DMID), enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, síndrome del intestino irritable, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diverticulosis, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, espondilitis anquilosante, esclerodermia, esclerosis sistémica, artritis psoriásica, osteoartritis, dermatitis atópica, vitíligo, enfermedad del injerto contra el huésped (EICH), linfoma cutáneo de células T (LCCT), síndrome de Sjogren, glomerulonefritis, nefropatía por IgA, enfermedad del injerto contra el huésped, rechazo de trasplantes, dermatitis atópica, síndrome antifosfolípido y asma, y otras enfermedades autoinmunes.
- 45 12. Uso de un anticuerpo anti-IL-21 según cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, o de una composición farmacéutica según la Reivindicación 9, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad autoinmune.