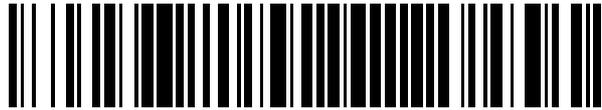


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 237**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2008 E 08878088 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2217268**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales anti-IL-21 humana**

30 Prioridad:

07.12.2007 US 12329 P

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

26.09.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JASPERS, STEPHEN, R.;
RIXON, MARK, W.;
DILLON, STACEY, R.;
RAMSDELL, FREDERICK, J.;
KREJSA, CECILE, M. y
YI, EUGENE, C.**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 584 237 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

Anticuerpos monoclonales anti-IL-21 humana

- 5 **[0001]** El sistema inmunológico es la defensa principal del cuerpo contra las enfermedades causadas por patógenos, es decir, bacterias, virus, hongos, etc., así como contra las enfermedades causadas por un crecimiento anormal de células y tejidos del propio cuerpo (es decir, tumores cancerosos). Normalmente, el sistema inmunológico es capaz de distinguir entre las células normales del cuerpo normales o "propias" y los patógenos extraños o células anormales o "no propias". Los procesos por los cuales el sistema inmunológico se abstiene de reaccionar con el propio cuerpo se llaman tolerancia. A veces, el sistema inmunológico pierde la capacidad de reconocer "propia" como normal y la posterior respuesta dirigida contra el tejido o las células, resulta en la pérdida de la tolerancia, un estado de autoinmunidad. Las patologías que resultan de la autoinmunidad a menudo tienen consecuencias clínicas graves y son uno de los principales problemas de salud en el mundo, especialmente en los países desarrollados.
- 10
- 15 **[0002]** IL-21 es una potente citoquina de tipo I de un haz de cuatro hélices α helicoidales inmunomoduladora que se une a un receptor heterodimérico compuesto de IL-21R y la cadena gamma común (revisado por Spolski y Leonard, Annu Rev Immunol 8 de noviembre; 2007). La IL-21 es producida por las células NK-T y T CD4 + (incluyendo células Th17 proinflamatorias y células T_{FH} auxiliares foliculares que son importantes para las respuestas de centros germinales) y tiene efectos pleiotrópicos sobre las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, incluyendo una mayor proliferación de células B y células T, el aumento de la citotoxicidad de las células T CD8 + y las células asesinas naturales (NK), la diferenciación de las células B en células plasmáticas secretoras de inmunoglobulina, y la regulación del linaje de células Th17 (ver a continuación). La IL-21 también puede inhibir la función de presentación de antígeno de las células dendríticas y puede inducir la apoptosis en las células B y células NK bajo ciertas condiciones. La IL-21 tiene una actividad anti-tumoral potente, pero también se ha asociado con el desarrollo de diversas enfermedades autoinmunes, incluyendo lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), enfermedad inflamatoria del intestino (EII) y la psoriasis (revisado por Spolski y Leonard, Annu Rev Immunol 8. Nov., 2007).
- 20
- 25
- 30 **[0003]** Se ha observado que la IL-21 modula las respuestas de anticuerpos actuando directamente sobre las células B. (Mehta et al, J. Immunol, 170: 4111-4118, 2003; Ozaki et al, Science, 298: 1630-1634, 2002; Suto et al, Blood, 100: 4565-4573, 2002). La IL-21 puede inducir la diferenciación de células B humanas sin tratar en células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Ozaki et al J. Immunol 173: 5361, 2004; Ettinger et al, J Immunol 175: 7867-79, 2005; Ettinger et al, J Immunol 178: 2872-82, 2007; Kuchen et al J Immunol 179: 5886-96, 2007) y estimular la producción de IgE en células B humanas (Kobayashi et al. Human Immunol. doi: 10. 1016/j.humimm.2008.10). En animales con deficiencia de IL-21 o IL-21R, se genera un menor número de células que secretan anticuerpos a partir de la reacción del centro germinal y se reduce la maduración de la afinidad (Zotos et al, aportado). Las células extrafoliculares formadoras de anticuerpos, que están implicados en la autoinmunidad, requieren una ayuda afín de un subconjunto de células T CD4 especializadas que secretan IL-21 (Odegard, et al, JEM 205 (12): 2873-2886, 2008).
- 35
- 40
- 45 **[0004]** La generación de anticuerpos contra MHC alogénico es un fenómeno clave en el rechazo del trasplante. Los receptores de trasplantes que desarrollan títulos de anticuerpos anti-MHC (pacientes de trasplante altamente sensibilizados) son de riesgo t para el rechazo crónico y son malos candidatos para nuevos injertos debido a la probabilidad de rechazo mediado por anticuerpos del nuevo trasplante (Smith, et al., Am J Transplantation 8: 1-11, 2008). En un modelo de rata de rechazo de aloinjerto renal agudo, IL-21 y IL-21R se incrementaron de forma única en las células mononucleares intravasculares de aloinjertos renales, pero no isoinjertos (Hecker, et al, Immunobiology: doi:10.1016/j.imbio.2008.04.004, (2008)). En los trasplantes cardíacos humanos que experimentan un rechazo, los niveles de expresión de IL-21 y IL-21R se correlacionan con el grado de rechazo ISHLT, y la más alta expresión está presente en los^oC1R y 2R (Baan, et al, Transplantation 83 (11): 1485-1492 , 2007).
- 50
- 55 **[0005]** En la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), la respuesta anti-alo está mediada por la activación incontrolada de los linfocitos T del injerto, que dirigen una respuesta inflamatoria contra los tejidos del huésped. Las células T reguladoras (Treg) pueden modular esta respuesta en modelos animales. Se ha observado que la IL-21 contrarresta las funciones reguladoras de Treg (Clough et al., J Immunol. 180: 5395-5401, 2008). En modelos de ratón de EICH, la transferencia de células T deficientes en IL-21 dio lugar a signos clínicos y puntuaciones histológicas significativamente reducidos y un aumento de la supervivencia, en comparación con las células T WT. Se observaron la disminución de la frecuencia de células T secretoras de IFN-gamma y un aumento de células T reguladoras en la mucosa del colon. El bloqueo de IL-21 utilizando mAAb anti-mIL-21 y la transferencia de células T WT produjo resultados similares (Bucher et al, Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008 112: Abstract # 2342).
- 60
- 65 **[0006]** También se ha observado recientemente que la IL-21 es producida por y necesaria para la diferenciación de células Th17 pro-inflamatorias de ratón (Kom et al Nature 448: 484-487, 2007; Nurieva et al Nature 448: 480-483, 2007; Zhou et al, Nat Immunol. 8: 967-974, 2007; Wei et al J Biol Chem 282: 34605-34610, 2007). Las células Th17 humanas también producen IL-21 y se están realizando estudios para determinar si la IL-21 actúa como un factor autocrino para las células Th17 humanas, como lo hace para las células Th17 de ratón. Ozaki et al. (J. Immunol. 173: 5361, 2004) demostraron que la expresión de IL-21 es elevada en los ratones BXSB-Yaa propensos al lupus,

un modelo para el lupus eritematoso sistémico (LES), a una edad cuando las primeras características de los procesos autoinmunes empiezan a ser evidentes. El tratamiento de estos ratones BXSB-Yaa con un receptor de IL-21 soluble de ratón (mIL-21R-Fc) inhibe parcialmente diversos parámetros de la enfermedad, incluyendo la glomerulonefritis (Bubier et al, Ann NY Acad Sci 1110: 590-601, 2007). El tratamiento con mIL-21R-Fc también se ha demostrado que es eficaz en otro modelo preclínico de la enfermedad de LES, el ratón MRL/lpr (Herber et al J. Immunol. 178: 3822-3830, 2007), así como en el modelo de artritis inducida por colágeno (AIC) de la artritis reumatoide (Young et al, Arthr Rheum. 56: 1152-1163, 2007). Los datos preliminares en humanos sugieren también la desregulación de IL-21 e IL-21R en el LES (Mitoma et al Int J Mol Med 16: 609-615 2005; Wang et al, Chineses J. Cell Mol Immunol 23 (11): 1041-1042, 2007; Sawalha et al Ann Rheum Dis. 67: 458-461, 2008). Más recientemente, Rus et al. Obtuvo datos de 24 pacientes con LES y 15 controles sanos (Nguyen et al., ACR/ARHP Scientific Meeting, 1760/482, 2008 Oct 24-29 San Francisco, CA). Rus et al. mostraron que 1) la expresión de ARNm de IL-21 es significativamente mayor en las células T CD4+ de los pacientes de lupus en comparación con los controles, 2) los niveles de IL-21 son significativamente elevados en los sueros de pacientes con LES activo en comparación con Les inactivo o controles, 3) IL-21 aumenta la proliferación de células T CD4+ y células B CD19+ en pacientes y se controla de una manera dependiente de la dosis, 4) IL-21 aumenta la diferenciación de células plasmáticas inducidas por anti-CD40 en los controles normales y pacientes con LES, y 5) los niveles elevados de IL-21 pueden contribuir a la proliferación de células T CD4+ autorreactivas y la diferenciación de células plasmáticas en LES.

[0007] Monteleone et al han demostrado que el ARN de IL-21 y la expresión de proteínas aumenta en tejido inflamado, pero no en no inflamado, de pacientes con enfermedad de Crohn (CD) (y, en menor grado, colitis ulcerosa) y que la producción de IL-21 por células CD3+ de las células mononucleares de la lámina propia de pacientes con EC también se ha mejorado (Monteleone et al Gastroenterology 128: 687-694, 2005; Monteleone et al Gut 55: 1774-1780, 2006; Peluso et al, J Immunol 178: 732-739, 2007). Estos autores sugirieron que la IL-21 regula la colitis experimental mediante la modulación del equilibrio entre las células T reguladoras (Tregs) y células Th17 (Fantini et al Eur J. Immunol. 37: 3155-3163, 2007). La inhibición de la IL-21 in vivo con un receptor de IL-21 soluble, ya sea en modelos de ratón o rata de colitis conduce a reducciones significativas en los signos clínicos de colitis (Young et al. EE.UU. 2006/0039902).

[0008] El receptor de IL-21 se expresa por las células NK, y células NK han demostrado ser sensibles al tratamiento con IL-21 tanto in vivo como in vitro. En pacientes oncológicos tratados con IL-21 humana recombinante, se observaron patrones alterados de recirculación en subgrupos de linfocitos, incluyendo células NK, y el aumento de la expresión de marcadores de activación de las células NK y la capacidad efectora citolítica (Frederiksen, et al., Cancer Immunol Immunother 57 (10) : 1439-1449, 2008). En las enfermedades autoinmunes, la actividad de células NK puede jugar un papel en la promoción de la inflamación y el daño tisular asociado. La migración de tejido de las células NK está dirigida por quimioatrayentes liberados en el sitio de la inflamación (Morris y Ley, Curr Mol Med.; 4 (4): 431-8, 2004). Las células NK de la lámina propia de pacientes con la enfermedad de Crohn liberaban mayores cantidades de IFN- γ y TNF- α cuando se estimulan in vitro con IL-21 e IgG, en comparación con las células LPNK de controles (Liu y Jiu, Chronic inflammation of liver and gut, Falk Symposium resumen N° 163 de 2008 Mar 14-15). También se describe que las células NK regulan la autoinmunidad y el rechazo de trasplantes a través de sus interacciones con las células dendríticas (DC), matando DC inmaduras o activadas, y mediante la liberación de citoquinas que afectan el estado de activación y las funciones de presentación de antígeno de la DC (Vivier et al., Nat Immunol 9 (5): 503-510, 2008; Laffont y otros, Blood 112: 661-671, 2008). Una comparación de las células mononucleares de sangre periférica de receptores de aloinjertos de hígado tolerantes y no tolerantes mostró cambios en el programa transcripcional de las células NK (Martínez-Llordella et al, J Clin Invest 118 (8): 2845-2857, 2008). Por lo tanto, el bloqueo de IL-21 puede modular el estado de activación de las células NK, reducir su contribución a la inflamación de los tejidos en enfermedades autoinmunes, y alterar la evolución clínica del rechazo del trasplante. También se describe que las células NK regulan la autoinmunidad y el rechazo de trasplantes a través de sus interacciones con células dendríticas (DC), matando DC inmaduras o activadas y mediante la liberación de citoquinas que afectan el estado de activación y alteran las funciones de presentación de antígeno de las DC. Por lo tanto, el bloqueo de IL-21 puede modular la activación de las células NK y reducir su contribución a la inflamación de los tejidos en enfermedades autoinmunes.

El documento US2007/172457 describe IL-21 e IL-22. WO 2007/111714 y US2007/122413 describen antagonistas de IL-21. El documento WO 2006/105538 describe procedimientos y composiciones para el tratamiento de patologías relacionadas con IL-21. El documento WO 2006/057027 describe epítopos antigénicos de IL-21, anticuerpos relacionados y sus usos en el campo médico. El documento DK 2005/01310 describe el tratamiento o la prevención de enfermedades autoinmunes y diabetes autoinmune latente en adultos.

Caruso et al., J. Gastroenterology 132 (1) 20 de enero de 2007, páginas 166-175, describe un papel funcional para IL-21 en la promoción de la síntesis de la quimioatrayente de células T MIP-3alfa por las células epiteliales intestinales.

Herber D. et al., J. Immunology 178 (6), 15 de marzo de 2007, páginas 3822-3830, informa que la IL-21 tiene un papel patogénico en un modelo de ratón propenso al lupus y su bloqueo con IL-21 R.Fc reduce la progresión de la enfermedad.

Young D.A. et al., Arthritis & Rheumatism 56 (4), 1 de Abril de 2007, páginas 1152-1163, informa que el bloqueo de la vía de IL-21/receptor de IL-21 mejora la enfermedad en modelos animales de artritis reumatoide.

Baan C.C. et al., Transplantation 83 (11), 15 de junio de 2007, páginas 1485-1492, informa que la IL-21 es un participante dependiente de IL-2 en procesos de rechazo.

[0009] La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-IL-21 humana tal como se define en las reivindicaciones. La memoria describe el uso de estos anticuerpos para inhibir los síntomas y las actividades biológicas que se manifiestan como trastornos autoinmunes e inflamatorios y se asocian con las interacciones IL-21/receptor de IL-21.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0010]

La Figura 1 es una alineación de residuos de aminoácido que comprende las regiones variables de cadena pesada de anticuerpos designados por números de clones 362.78.1.44 (78), 362.597.3 (597), 362.75.1.1 (75), 366.552.11 (552), 366.328.10 (328).

La Figura 2 es una alineación de residuos de aminoácido que comprenden la región variable de cadena ligera de los anticuerpos descritos anteriormente.

La Figura 3 ilustra espectros de masas MALDI/TOF de las regiones de secuencia de péptidos IL-21 obtenidos a partir de IL-21 solo y el complejo inmune de IL-21. Secuencias de péptidos de IL-21, EKKPPKEF (SEQ ID NO: 2 desde el residuo 129 al 136) (m/z, 1002,5619 Da) y LERFKSLL (SEQ ID NO: 2 desde el residuo 137 al 144) (m/z, 1005,6091 Da) del estado libre de la IL-21 (A). Desplazamiento de masa del péptido debido a la retención de deuteración de amida en presencia de mAb de IL-21 (B). Otra región de secuencia de péptido IL-21, KSLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO: 2 desde el residuo 141 al 162) (m/z, 2519,2451) del estado libre de la IL-21 (C). Un desplazamiento de masa parcial del péptido debido a la retención de deuteración de amida en presencia de mAb de IL-21 (D).

La Figura 4 ilustra cromatogramas de iones seleccionados de péptidos acetilados y no acetilados. Cromatograma de ion único seleccionado de TCPSCDSYEKKPPKEF (SEQ ID NO: 2 desde el residuo 119 a 136) (m/z, 1986 Da) acetilado aislado de IL-21 solo (A) y la misma traza cromatográfica del complejo inmune de IL-21 (B). El espectro de masas incorporado es el estado triplemente cargado de la masa del péptido (m/z, 662,9). La tercera traza muestra el cromatograma de iones seleccionados del ion del péptido a m/z 1018 Da, que es KSLQKMI (SEQ ID NO: 2 desde el residuo 141 al 148) acetilado aislado de IL-21 solo (C) y la misma traza cromatográfica del complejo inmune de IL-21 (D). El espectro de masas incorporado es el estado doblemente cargado de la masa del péptido (m/z, 509.1)

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[0011] En un aspecto, la presente memoria describe un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana que comprende al menos un 80% de identidad con los residuos de aminoácido 20 a 145 de SEQ ID NO: 29 y al menos un 80% de identidad con los residuos de aminoácido 21 a 126 de la SEQ ID NO: 37. En ciertas realizaciones, los anticuerpos comprenden cambios de al menos un 80% de identidad que se encuentran en la región variable de cadena pesada CDR1 de la SEQ ID NO: 31.

[0012] La presente invención describe un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana, que comprende: (a) una región de cadena pesada que comprende: (i) una CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 31; (ii) una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 33; y (iii) una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 35; y (b) una región de cadena ligera que comprende: (i) una CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 39; (ii) una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 41; y (iii) una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 43. En ciertas realizaciones, la memoria proporciona un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 que comprende los residuos aminoácidos 20 a 145 de SEQ ID NO: 29 y los residuos de aminoácido 21-126 de la SEQ ID NO: 37. En otras realizaciones, el anticuerpo comprende además los residuos de aminoácido 1 a 145 de SEQ ID NO: 29 y de aminoácidos de residuos 1 a 126 de SEQ ID NO: 37. Otra realización de la presente invención proporciona un hibridoma designado 362.78.1.44, en el que el hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con la designación de depósito bajo patente ATCC PTA-8790, y la memoria incluye el anticuerpo producido por el hibridoma.

[0013] Otro aspecto de la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana, tal como se define en las reivindicaciones, que comprende: (a) una región de cadena pesada que comprende: (i) una CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 47; (ii) una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 49; y (iii) una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 51; y (b) una región de cadena ligera que comprende: (i) una CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 55; (ii) una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 57; y (iii) una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 59. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana, tal como se define en las reivindicaciones, que comprende los residuos aminoácidos 20 a 145 de SEQ ID NO: 45 y los residuos de aminoácido 21 a 126 de SEQ ID NO: 53. En otras realizaciones, el anticuerpo, tal como se define en las reivindicaciones, comprende además los residuos de aminoácido 1 a 145 de SEQ ID NO: 45 y los residuos de aminoácido 21 a 126 de SEQ ID NO: 53. La memoria describe un hibridoma designado 362.597.3, en el que el hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con la designación de depósito bajo patente ATCC PTA-8786. La presente invención incluye un anticuerpo producido por el hibridoma, tal como se define en las

reivindicaciones.

[0014] La presente memoria describe un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana que comprende al menos un 80% de identidad con los residuos de aminoácido 20 a 141 de SEQ ID NO: 13 y al menos un 80% de identidad con los residuos de aminoácido 21 a 126 de la SEQ ID NO: 21. En una realización, la presente invención incluye un anticuerpo monoclonal, en el que los cambios de aminoácidos son cambios conservadores de aminoácidos.

[0015] La presente memoria describe un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana, que comprende: (a) una región de cadena pesada que comprende: (i) una CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 15; (ii) una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 17; y (iii) una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 19; y (b) una región de cadena ligera que comprende: (i) una CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 23; (ii) una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 25; y (iii) una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 27. La presente memoria describe un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana que comprende los residuos de aminoácido 20-141 de SEQ ID NO: 13 y los residuos de aminoácido 21 a 126 de SEQ ID NO: 21. La memoria describe los residuos de aminoácido 1 a 141 de SEQ ID NO: 13 y los residuos de aminoácido 1 a 126 de SEQ ID NO: 21. La presente memoria describe un hibridoma designado 362.75.1.1, en el que el hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con la designación de depósito bajo patente ATCC PTA-8791, y el anticuerpo producido por el hibridoma.

[0016] En otro aspecto, la presente memoria describe un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana, que comprende: (a) una región de cadena pesada que comprende: (i) una CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 79; (ii) una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 81; y (iii) una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 83; y (b) una región de cadena ligera que comprende: (i) una CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 87; (ii) una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 89; y (iii) una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 91. La presente memoria describe un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana que comprende los residuos aminoácidos 20 a 136 de SEQ ID NO: 77 y el ácido amino los residuos 23 a 129 de SEQ ID NO: 85. La presente memoria describe los residuos de aminoácido 1 a 136 de SEQ ID NO: 77 y los residuos de aminoácidos 1 a 129 de SEQ ID NO: 85. La presente memoria describe un hibridoma designado 366.552.11, en el que el hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con la designación de depósito bajo patente ATCC PTA-8787, y el anticuerpo producido por el hibridoma.

[0017] La presente memoria describe un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana, que comprende: (a) una región de cadena pesada que comprende: (i) una CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 63; (ii) una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 65; y (iii) una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 67; y (b) una región de cadena ligera que comprende: (i) una CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 71; (ii) una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 73; y (iii) una CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 75. La presente memoria describe un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana que comprende los residuos de aminoácido 20 a 139 de SEQ ID NO: 61 y los residuos de aminoácido 23 a 129 de SEQ ID NO: 69. La presente memoria describe los residuos de aminoácido 1 a 139 de SEQ ID NO: 61 y los residuos de aminoácido 1 a 129 de SEQ ID NO: 69. La presente memoria describe un hibridoma designado 366.328.10, en el que el hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con la designación de depósito bajo patente ATCC PTA-8789, y el anticuerpo producido por el hibridoma.

[0018] La presente memoria describe un hibridoma designado 366.345.6.11, en el que el hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con la designación de depósito bajo patente ATCC PTA-8788, y el anticuerpo producido por el hibridoma.

[0019] La presente memoria describe un anticuerpo monoclonal aislado que se une a un epítipo discontinuo que comprende al menos dos regiones en una proteína IL-21, en el que la primera región consiste en al menos un aminoácido del residuo Ile45 al residuo Leu56 de SEQ ID NO: 2 y la segunda región consiste en al menos un aminoácido del residuo Glu129 al residuo Leu144 de la SEQ ID NO: 2, tal como cuando la primera región consiste en entre 1 y 12 aminoácidos desde el residuo Ile45 al residuo Leu56 de la SEQ ID NO: 2, y la segunda región consiste en entre 1 y 16 aminoácidos desde el residuo Glu129 al residuo Leu144 de la SEQ ID NO: 2.

[0020] En cada aspecto de las invenciones descritas anteriormente, se incluye una realización en la que el anticuerpo monoclonal comprende adicionalmente una porción de Fc, y otra realización, en la que la porción Fc se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2 e IgG4, y otra realización, en la que la porción de Fc tiene una función efectora reducida.

[0021] La presente invención proporciona un anticuerpo, tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por células T auxiliares foliculares o mediadas por células B en un sujeto mediante la administración de una cantidad terapéutica de los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 humana reivindicados descritos en el presente documento, en el que las enfermedades mediadas por células T auxiliares

foliculares o mediadas por células B se seleccionan del grupo que consiste en lupus eritematoso sistémico, pérdida de audición autoinmune, enfermedad de Graves, pénfigo vulgar, miastenia gravis, neuromielitis óptica, síndrome de Goodpasture, nefritis autoinmune, crioglobulinemia, síndrome de Guillain Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), anemia hemolítica autoinmune y púrpura trombocitopénica idiopática (PTI).

[0022] La presente memoria describe el tratamiento de enfermedades mediadas por células TH1 o células TH17 en un sujeto mediante la administración de una cantidad terapéutica de los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 humana reivindicados descritos en el presente documento, en el que las enfermedades mediadas por células TH1 o células TH17 se seleccionan del grupo que consiste en psoriasis, espondiloartropatía, artritis reactiva, artritis enteropática, miocarditis autoinmune, enfermedad de Kawasaki, enfermedad celíaca, uveítis, enfermedad de Behcet, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la enfermedad pulmonar intersticial.

[0023] La presente invención proporciona un anticuerpo, tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un sujeto, en el que la enfermedad inflamatoria intestinal se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable.

[0024] En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo, tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide en un sujeto.

[0025] En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo, tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple en un sujeto.

[0026] En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo, tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de diabetes de tipo I (DMID) en un sujeto.

[0027] En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo, tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento del síndrome de Sjogren en un sujeto.

[0028] En otro aspecto, la presente memoria describe el tratamiento de un sujeto con trasplante mediante la administración de una cantidad terapéutica de los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 humana reivindicados descritos en el presente documento, en el que se suprime el rechazo del trasplante, se establece tolerancia en el régimen terapéutico pretrasplante o se reducen los títulos de aloanticuerpos títulos en el sujeto.

[0029] En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo, tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un sujeto mediante la administración de una cantidad terapéutica de los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 humana reivindicados descritos en el presente documento, en el que la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en pancreatitis, enfermedad inflamatoria de los músculos (polimiositis, dermatomiositis), poliangeítis microscópica, anemia aplásica autoinmune, tiroiditis autoinmune, hepatitis autoinmune, síndrome de Wegener, diverticulosis, espondilitis anquilosante, esclerodermia, esclerosis sistémica, artritis psoriásica, osteoartritis, dermatitis atópica, vitiligo, enfermedad injerto contra huésped (EICH), linfoma cutáneo de células T (LCCT), glomerulonefritis, nefropatía por IgA, pacientes con trasplante altamente sensibilizados, síndrome anti-fosfolípido, y el asma, y otras enfermedades autoinmunes, u otras enfermedades mediadas por IL-21 y agonistas de receptores de IL -21.

[0030] En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo, tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento del lupus eritematoso sistémico (LES) en un sujeto.

[0031] En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo, tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de la psoriasis en un sujeto.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0032] Se proporcionan las siguientes definiciones para facilitar la comprensión de las invenciones descritas en el presente documento.

[0033] Los términos "amino-terminal" y "carboxilo terminal" se usan en el presente documento para indicar posiciones dentro de polipéptidos. Cuando el contexto lo permite, estos términos se usan con referencia a una secuencia o porción particular de un polipéptido para indicar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una cierta secuencia situada carboxi-terminal a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido se encuentra proximal al extremo carboxilo de la secuencia de referencia, pero no está necesariamente en el extremo carboxilo del polipéptido completo.

[0034] El término "antagonista" se refiere a cualquier compuesto que incluye una proteína, polipéptido, péptido, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, molécula grande, o una molécula pequeña (menos de 10 kD), que disminuye la

actividad, la activación o la función de otra molécula. Los antagonistas de IL-21 causan por lo menos una de las siguientes acciones: función inmune reducida de las células NK, células dendríticas, subgrupos de células T y subconjuntos de células B; unión a IL-21 de manera que la interacción de la proteína IL-21 con su receptor se bloquee, inhibe, reduce o neutraliza.

5 **[0035]** "Anticuerpos" (Abs) e "inmunoglobulinas" (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos presentan especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que carecen de especificidad antigénica. Los polipéptidos de la última clase son, por ejemplo, producidos a niveles bajos por el sistema linfático y a niveles altos por los mielomas. Por lo tanto, tal como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" o "péptido o péptidos 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, los fragmentos de unión se producen mediante técnicas de ADN recombinante. En realizaciones adicionales, los fragmentos de unión se producen por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, y anticuerpos de cadena única, ScFv. Los "anticuerpos e inmunoglobulinas nativas" son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácido particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y pesada (Chothia et al, J. Mol Biol 186: 651 (1985); Novotny y Haber, Proc Natl Acad Sci. USA. 82: 4592 (1985)).

30 **[0036]** El término "anticuerpo quimérico" o "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos cuyos genes de cadena ligera y pesada se han construido, típicamente por ingeniería genética, a partir de genes de la región variable y constante de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón pueden unirse a segmentos constantes humanos, tales como gamma 1 y gamma 3. Un anticuerpo típico quimérico terapéutico es por tanto una proteína híbrida compuesta del dominio variable o de unión a antígeno de un anticuerpo de ratón y el dominio constante de un anticuerpo humano, aunque pueden utilizarse otras especies de mamíferos. Específicamente, un anticuerpo quimérico se produce por tecnología de ADN recombinante en el que todo o parte de las regiones bisagra y constante de una cadena ligera, cadena pesada, o ambas, de inmunoglobulina se han sustituido por las regiones correspondientes de la cadena ligera o cadena pesada de inmunoglobulina de otro animal. De esta manera, la porción de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal padre se injerta en el esqueleto del anticuerpo de otra especie.

40 **[0037]** El término "epítipo" se refiere a cualquier determinante de proteína que puede unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T específica. Los determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas, tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcares y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Más específicamente, el término "epítipo de IL-21", como se usa en el presente documento, se refiere a una porción del polipéptido IL-21 que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferiblemente en un mamífero, y más preferiblemente en un ratón o un ser humano. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es una porción de un polipéptido IL-21 que provoca una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es una porción de un polipéptido IL-21 a la que un anticuerpo se une inmunoespecíficamente como se determina por cualquier método bien conocido en la técnica, por ejemplo, mediante inmunoensayos. Los epítipos antigénicos no necesitan ser necesariamente inmunogénicos. Los "epítipos discontinuos" son epítipos conformacionales formados a partir de al menos dos regiones separadas de la secuencia primaria de la proteína IL-21. Los epítipos conformacionales pierden la capacidad de unirse específicamente en presencia de disolventes desnaturalizantes (por ejemplo, en los análisis de transferencia Western).

55 **[0038]** La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos, tal como se describen en las reivindicaciones, que se unen específicamente a proteínas y polipéptidos IL-21, como se define en las reivindicaciones. Los polipéptidos, proteínas y polinucleótidos que codifican los polipéptidos de IL-21 humanos y de ratón se describen en Parrish-Novak y otros, Nature 408: 57-63, 2003; las patentes de Estados Unidos nº 6.307.024 y 6.686.178; y 7.250.274. Se describen en este documento las características estructurales y funcionales que definen regiones (epítipos) de la proteína IL-21 humana que han sido identificadas como dianas para un anticuerpo monoclonal terapéutico. Se presentan anticuerpos monoclonales anti-IL-21 humanas de humanos de ejemplo. Algunos de estos anticuerpos tienen la capacidad de unirse a IL-21 humana nativa, IL-21, IL-21 humana de tipo salvaje recombinante, una proteína de IL-21 mutante recombinante y/o regiones peptídicas de IL-21 humana.

65 **[0039]** La presente invención proporciona anticuerpos anti-IL-21 tal como se definen en las reivindicaciones, que son útiles en el tratamiento terapéutico de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Por ejemplo, los anticuerpos anti-

IL-21 son útiles en el tratamiento de la psoriasis, pancreatitis, diabetes tipo I (IDDM), enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis reactiva, artritis enteropática, espondiloartropatía, miocarditis autoinmune, enfermedad de Kawasaki, enfermedad celíaca, uveítis, enfermedad de Behcet, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad de músculo inflamatorio (polimiositis, dermatomiositis), poliangeítis microscópica, anemia aplásica autoinmune, tiroiditis autoinmune, hepatitis autoinmune, síndrome de Wegener, diverticulosis, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, esclerodermia, esclerosis sistémica, artritis psoriática, osteoartritis, dermatitis atópica, vitiligo, enfermedad injerto contra huésped (EICH), linfoma cutáneo de células T (LCCT), síndrome de Sjogren, glomerulonefritis, nefropatía IgA, nefritis autoinmune, pénfigo vulgar, miastenia gravis, pérdida de audición autoinmune, neuromielitis óptica, síndrome de Goodpasture, crioglobulinemia, síndrome de Guillain Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), rechazo de trasplante, pacientes de trasplante altamente sensibilizados, síndrome anti-fosfolípido, alergia y asma, y otras enfermedades autoinmunes, u otras enfermedades mediadas por IL-21 y agonistas de receptores de IL -21.

[0040] Se han identificado cinco clases de inmunoglobulinas, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, en los vertebrados superiores. Las proteínas IgG, IgD, e IgE son característicamente heterotetrámeros unidos por enlaces disulfuro que consisten en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Típicamente, IgM se encuentra como un pentámero de un tetrámero, mientras que IgA se produce como un dímero de un tetrámero. Se pueden introducir modificaciones en el resto de inmunoglobulina.

[0041] IgG comprende la clase principal, ya que normalmente existe como la segunda proteína más abundante en el plasma. En los seres humanos, la IgG consta de cuatro subclases, denominadas IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. Cada cadena pesada de inmunoglobulina posee una región constante que consiste en dominios de proteína de la región constante (C_H1, bisagra, C_H2, y C_H3) que son invariantes para una subclase determinada. Las regiones constantes de cadena pesada de la clase IgG se identifican con el símbolo griego γ . Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la subclase IgG1 contienen una región constante de cadena pesada γ 1.

[0042] El fragmento Fc o el dominio Fc, consiste en las regiones de bisagra dominios CH₂, CH₃ de cadena pesada unidas por disulfuro. En las proteínas de fusión de inmunoglobulina, los dominios Fc de la subclase IgG1 se utilizan a menudo como el resto de inmunoglobulina, ya que IgG1 tiene la vida media más larga en suero de cualquiera de las proteínas de suero. La larga vida media en suero puede ser una característica deseable de la proteína para los estudios en animales y el potencial uso terapéutico humano. Además, la subclase IgG1 posee la capacidad más fuerte para llevar a cabo funciones efectoras mediadas por anticuerpos. La función efectora primaria que puede ser más útil en una proteína de fusión de inmunoglobulina es la capacidad de un anticuerpo IgG1 para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Por otra parte, esto podría ser una función indeseable para una proteína de fusión que funciona principalmente como un antagonista. Se han identificado varios de los residuos de aminoácido específicos que son importantes para la actividad mediada por región constante de anticuerpo en la subclase IgG1. La inclusión o exclusión de estos aminoácidos específicos, por lo tanto permite la inclusión o exclusión de la actividad mediada por región constante de inmunoglobulina específica (véase, patentes de Estados Unidos 5.648.260; 5.624.821).

[0043] Las Fc de IgG1 humana modificada se han generado para la creación de proteínas de fusión con Fc. Por ejemplo, las mutaciones Fc4, Fc5, y Fc6 para reducir las funciones efectoras mediadas por Fc mediante la reducción de la unión a Fc γ RI y la unión a complemento C1q se describen en la solicitud de patente US 2006-0034852. Específicamente, se introdujeron tres sustituciones de aminoácidos para reducir la unión a Fc γ RI. Estas son las sustituciones en las posiciones de índice EU 234, 235, y 237. Las sustituciones en estas posiciones se han demostrado que reducen la unión a Fc γ RI (Duncan et al, Nature 332: 563 (1988)). Estas sustituciones de aminoácidos también pueden reducir la unión a Fc γ RIIa, así como la unión a Fc γ RIII (Sondermann y otros, Nature 406: 267 (2000); Wines et al, J. Immunol 164: 5313 (2000)). Estas mutaciones no alteran la unión a FcRn, que promueve la larga vida media en suero mediante el rescate de IgG a través de una vía de reciclaje endocítico.

[0044] Varios grupos han descrito la importancia de las posiciones del índice de UE 330 y 331 en la unión a complemento C1q y la posterior fijación del complemento (Canfield y Morrison, J. Exp Med 173: 1483 (1991); Tao et al, J. Exp. Med. 178: 661 (1993)). Las sustituciones de aminoácidos en estas posiciones se introdujeron en Fc4 para reducir la fijación del complemento. El dominio C_H3 de Fc4 es idéntico al encontrado en el polipéptido de tipo salvaje correspondiente, excepto por el codón de parada, que se cambió de TGA a TAA para eliminar un sitio potencial de metilación madre cuando el ADN clonado crece en madre más cepas de E. coli. En Fc5, el residuo de arginina en la posición del índice UE 218 es una lisina y el resto de la secuencia de Fc5 coincide con la descripción anterior para Fc4.

[0045] La presente memoria describe 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 aminoácido y una o más deleciones o adiciones de aminoácidos que no alteren significativamente de un modo deletéreo la utilidad de unión a antígeno. Las substituciones pueden variar desde un cambio o modificación de uno o más residuos de aminoácido 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 (por ejemplo, acetilación y fosforilación) o pueden ser modificados sintéticamente (por ejemplo, unión de un grupo marcador).

[0046] Los anticuerpos de la presente invención pueden ser descritos o especificados en términos del epítipo o epítipos o de la porción porciones de un polipéptido de la presente invención a los que reconocen o a los que se unen específicamente. El epítipo o epítipos o la porción porciones de polipéptido pueden ser especificados como se describe en el presente documento, por ejemplo, por las posiciones N-terminales y C-terminales, o por el tamaño en residuos de aminoácido 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.

[0047] 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 epítipos, o a epítipos solapantes, sobre la proteína. Se pueden usar entonces familias de anticuerpos (o "bins") que tienen la misma especificidad de unión o solapante para ayudar a definir epítipos específicos sobre la IL-21. Los experimentos de binning epitópico proporcionan evidencia de que hay presencia de epítipos antígenicamente distintos. Sin embargo, por sí mismos no identifican, o "mapean" el epítipo en una secuencia de aminoácidos o localización específica sobre la molécula de la proteína IL-21.

[0048] 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 "biespecíficos" o "bifuncionales", la especificidad de unión de los dos diferentes sitios de unión necesita ser evaluada o "binned" independientemente.

[0049] La presente invención incluye anticuerpos específicos de ligando, tal como se define en las reivindicaciones. 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 la unión de un ligando a su receptor o la actividad de su receptor mediada por ligando. Con frecuencia, se pueden correlacionar las propiedades favorables de una familia (o bin) de anticuerpos con una unión a un epítipo específico definido por el bin epitópico.

[0050] 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.

[0051] Los anticuerpos anti-IL-21 pueden ser también útiles en ensayos diagnósticos para la proteína IL-21, por ejemplo, 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 epítipos, 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, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 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.

[0052] 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, por ejemplo, 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 Laborator y Manual, Cold Spring Harbor Laborator y , Ed. Harlow and David Lane (1988).

[0053] El BIACORE® (GE Healthcare, Piscataway, NJ) es sólo uno de varios formatos de ensayo rutinariamente utilizados para determinar los epitopos de paneles de bins de anticuerpos monoclonales. Muchas referencias (por ejemplo, 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 proporcionarían 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® (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Se puede usar el programa BIAlogue® v. 1.2 para programar los métodos de operación. 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 policlona (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 inocupados sobre el chip son entonces bloqueados usando un fragmento Fc de IgG policlona (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). A 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 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).

[0054] 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 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 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 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.

[0055] Los anticuerpos específicos de ligando de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, se pueden unir simplemente a o actuar como antagonistas de IL-21. La presente memoria incluye anticuerpos que no alteran las interacciones receptor/ligando de IL-21 o 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 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 (por ejemplo, tirosina o serina/treonina) del receptor o de su substrato por inmunoprecipitación seguida de 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.

Producción de anticuerpos anti-IL-21

[0056] Los anticuerpos para IL-21 se pueden generar, por ejemplo, utilizando proteína que es el producto de un vector de expresión de IL-21 o IL-21 aislado de una fuente natural como un antígeno. Los anticuerpos anti-IL-21 de la presente invención "se unen específicamente" a la IL-21. Los anticuerpos se considera que se unen específicamente si los anticuerpos exhiben al menos una de las dos propiedades siguientes: (1) anticuerpos se unen

a IL-21 con un nivel umbral de actividad de unión, y (2) los anticuerpos reaccionan de forma cruzada de forma significativa con los polipéptidos relacionados con IL-21. Los polipéptidos relacionados podrían incluir los de otros miembros de las citoquinas de tipo 1 que se unen a receptores que contienen la cadena gamma común (γ c), tales como IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15.

[0057] 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 como se refleja en las constantes de afinidad medidas. Para determinar las características de afinidad, se evaluaron las mediciones de las constantes de velocidad cinética, las constantes de equilibrio de asociación, y constantes de equilibrio de disociación para la interacción de antagonistas de IL-21 con el antígeno de IL-21 a través de resonancia de plasmón superficial. La constante de velocidad de asociación (k_a ($M^{-1}s^{-1}$)) es un valor que refleja la velocidad de la formación del complejo antígeno-antagonista. La constante de velocidad de disociación (k_d (s^{-1})) es un valor que refleja la estabilidad de este complejo. La afinidad de unión en equilibrio se expresa típicamente como una constante de equilibrio de disociación ($K_D(M)$) o una constante de asociación de equilibrio (K_A (M^{-1})). K_D se obtiene dividiendo la constante de velocidad de disociación por la constante de velocidad de asociación (k_d/k_a), mientras que K_A se obtiene dividiendo la constante de velocidad de asociación por la constante de velocidad de disociación (k_a/k_d). Los antagonistas con K_D similar (o una K_A similar) pueden tener constantes de velocidad de asociación y disociación muy variables. En consecuencia, la medición de la k_a y k_d , así como de K_A o K_D ayuda a describir más de forma exclusiva la afinidad de la interacción antagonista-antígeno. La afinidad preferida de un anticuerpo se refleja en una K_A (constante de equilibrio de asociación) de $10^6 M^{-1}$ o mayor, preferiblemente $10^7 M^{-1}$ o mayor, más preferiblemente $10^8 M^{-1}$ o mayor, y lo más preferiblemente $10^9 M^{-1}$ o mayor. La afinidad de unión de un anticuerpo puede ser determinada fácilmente por un experto ordinario en la técnica, por ejemplo, por análisis Scatchard (Scatchard, Ann NY Acad Sci 51: 660, 1949), o utilizando un instrumento biosensor disponible comercialmente. Con respecto a la segunda característica, los anticuerpos que no reaccionan de forma cruzada significativamente con moléculas de polipéptidos relacionados, por ejemplo, si detectan IL-21, pero no otros polipéptidos conocidos usando un análisis de transferencia Western estándar o ELISA de captura. Los ejemplos de polipéptidos relacionados conocidos incluyen miembros de la familia IL-2 a la que pertenece IL-21 (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15).

[0058] Se pueden producir anticuerpos anti-IL-21 usando péptidos y polipéptidos portadores portadores de epitopos de IL-21 antigénicos. Los anticuerpos de la presente invención se unen a péptidos y polipéptidos portadores de epitopos antigénicos que contienen una secuencia de al menos nueve, o de entre 15 y aproximadamente 30, aminoácidos contenidos en el SEQ ID NO: 2 u otra secuencia de aminoácidos divulgada en el presente documento. Sin embargo, los péptidos o polipéptidos que comprendan una porción mayor de una secuencia de aminoácidos de que contenga de 30 a 50 aminoácidos, o cualquier longitud hasta, e inclusive, la totalidad de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, 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 disolventes acuosos (es decir, que la secuencia incluye residuos relativamente hidrofílicos, mientras que normalmente se evitan los residuos hidrofóbicos). Además, también pueden ser deseables secuencias de aminoácidos que contengan residuos de prolina para la producción de anticuerpos.

[0059] 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)).

[0060] 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, por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo de la invención, requiere la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifique el anticuerpo. Una vez 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, por ejemplo, la Publicación PCT WO 86/05807, la Publicación PCT WO 89/01036 y la Patente EE.UU. N° 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.

[0061] 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 memoria describe 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.

[0062] 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. Éstos incluyen, aunque sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *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 (por ejemplo, *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 (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de plantas infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, 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).

[0063] 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.

[0064] 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).

[0065] 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, por ejemplo, la secuencia del promotor tardío y del líder tripartito. Este gen quimérico puede a continuación ser insertado en el genoma del adenovirus por recombinación in vitro o in vivo. La inserción en una región no esencial del genoma vírico (por ejemplo, región E1 o E3) dará lugar a un virus recombinante viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en hospedadores infectados (por ejemplo, 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).

5 [0066] 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 (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, 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 transcripto 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.

20 [0067] 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 (por ejemplo, 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 a continuación 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 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.

30 [0068] 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 fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48: 202, 1992) y de la adenina fosforribosiltransferasa (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 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 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.

50 [0069] 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 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).

60 [0070] La célula huésped puede ser cotransfectada con dos vectores de expresión, 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. Acad. Sci. USA* 77: 2197, 1980). Las secuencias codificantes para las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.

65 [0071] Una vez se ha expresado recombinantemente una molécula de anticuerpo de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, ésta puede ser purificada por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de

una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, 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.

5 [0072] 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 (abâ?) 2. Se puede volver a escindir este fragmento usando un agente reductor tiol, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3, 5S. Eventualmente, la 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.

20 [0073] 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.

25 [0074] 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. Natâ? 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).

30 [0075] 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).

40 [0076] 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 epítopos descritos en el presente documento, sobre una molécula diana. En algunos casos, el multímero puede formarse a partir de varios dominios monoméricos. (Véanse, por ejemplo, la Solicitud de Patente EE.UU. 2004-0132028 y la Solicitud de Patente EE.UU. 2006-0177831).

50 [0077] Los anticuerpos de la presente invención, tal como se definen en las reivindicaciones, 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 bloquee la activación del receptor. Por ejemplo, aunque no a modo de limitación, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que han sido modificados, por ejemplo, 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.

60 [0078] 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 .

65 [0079] Los inmunoconjugados anti-IL-21 pueden ser también marcados con un compuesto fluorescente. Se determina la presencia de un anticuerpo fluorescentemente marcado exponiendo el inmunoprecipitado a luz de la

longitud de onda apropiada y detectando la fluorescencia resultante. Como compuestos marcadores fluorescentes, se incluyen isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído, colorantes Alexa, nanopartículas fluorescentes (por ejemplo, puntos Q) y fluorescamina.

5 **[0080]** Es también posible poder marcar los inmunocombinados anti-IL-21 detectablemente combinando un componente de anticuerpo con un compuesto quimioluminiscente. Se determina la presencia del inmunocombinado 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.

10 **[0081]** De forma similar, se puede usar un compuesto bioluminiscente para marcar los inmunocombinados anti-IL-21. 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 bioluminiscente detectando la presencia de luminiscencia. Como compuestos bioluminiscentes útiles para marcaje, se incluyen luciferina, luciferasa y aequorina.

15 **[0082]** Alternativamente, se pueden marcar detectablemente inmunocombinados anti-IL-21 uniendo un componente de anticuerpo anti-IL-21 a una enzima. Cuando se incubaba el combinado anti-IL-21-enzima en presencia del sustrato apropiado, el resto enzimático reacciona con el sustrato 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 inmunocombinados poliespecíficos, se incluyen β -galactosidasa, glucosa oxidasa, peroxidasa y fosfatasa alcalina.

20 **[0083]** Los expertos en la técnica conocerán otros marcajes adecuados que pueden emplearse en el presente documento. 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. J. Cancer 46: 1101, 1990; Stein y col., Cancer Res. 50: 1330, 1990; y Coligan, antes citado.

25 **[0084]** Además, se pueden aumentar la conveniencia y la versatilidad de la detección inmunológica usando anticuerpos anti-IL-21 que han sido combinados 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).

30 **[0085]** Los métodos para realizar inmunosayos 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); Perr y , "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).

35 **[0086]** 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 (por ejemplo, substituyendo, suprimiendo o añadiendo) residuos de aminoácido identificados como implicados en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn (véanse, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales N° 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 combinados anticuerpo-PEG por, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño o de intercambio iónico.

Composiciones farmacéuticas

60 **[0087]** La presente memoria describe 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, por ejemplo, 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, dihidroxiantracínodiona, 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 (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiaminoplatino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimitóticos (por ejemplo, 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, IFN- α , IFN- β , 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, por ejemplo, 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"), anticuerpos diseñados para antagonizar modificadores de respuestas biológicas, otros anticuerpos, otras proteínas de fusión Fc u otros factores de crecimiento.

[0088] 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.

[0089] 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 Deliver", y en *Drug Deliver y Systems*, Ranade and Hollinger (eds.) , páginas 51-93 (CRC Press 1995); Roskos y Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Deliver", y en *Protein Deliver: 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).

[0090] 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 Deliver y Systems*, 5ª Edición (Lea & Febiger 1990); Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª Edición (Mack Publishing Company 1995) , y Ranade y Hollinger, *Drug Deliver y Systems* (CRC Press 1996).

[0091] 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.

[0092] 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, comprimidos 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 Deliver y", en *Drug Deliver y Systems*, Ranade and Hollinger (eds.) , páginas 95-123 (CRC Press 1995) ; Bremer y col., "Protein Deliver y with Infusion Pumps", en *Protein Deliver y : Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.) , páginas 239-254 (Plenum Press 1997) ; Yewey y col., "Deliver y of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant", en *Protein Deliver y : Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), páginas 93-117 (Plenum Press 1997)) . Otras formas sólidas incluyen cremas, pastas, otras aplicaciones topológicas y similares.

Usos terapéuticos para anticuerpos anti-IL-21

[0093] La IL-21 es una citoquina derivada de células T CD4⁺ que es importante para una inmunidad mediada por células T CD8⁺ óptima, la activación de células NK, y respuestas humorales óptimas, tales como la producción de

anticuerpos y la maduración de células B. Se ha demostrado que IL-21 induce una serie de quimiocinas y citoquinas proinflamatorias, tales como IL-18, IL-15, IL-5, IL-6, IL-7A, IL-17F, TNFR2, sCD25, y RANTES. IL-21 también induce una respuesta de fase aguda en primates no humanos y seres humanos cuando se administra por vía IV o inyección SC (Dodds et al., *Cancer Immunol Immunother* 17 de octubre de 2008 [publicación electrónica]). In vitro, estimula el crecimiento de ciertas poblaciones de células inmunes neoplásicas, tales como células de mieloma múltiple y leucemia aguda de células T (Brenne et al *Blood* 99 (10): 3756-62 (2002), DiCarlo E, et al *Cancer Immunol Immunother* 56 (9): 1323-1324 (2007)). IL-21 también es producida por las células de Hodgkin Reed-Stemberg en el linfoma de Hodgkin (Lamprecht y otros, *Blood* 112 (8): 3339-47, 2008). El aumento de expresión del receptor de IL-21 se ha observado en la epidermis en pacientes con esclerosis sistémica (Distler et al, *Arthritis & Rheumatism* 52: 865-864, 2004) y fibroblastos sinoviales de la artritis reumatoide (Jungel et al, *Arthritis & Rheumatism* 50: 1468-1476, 2004). Por otra parte, los ratones NOD diabéticos autoinmunes han aumentado la expresión del receptor IL-21 (King et al, *Cell* 117: 265-277, 2004.) Se ha demostrado que la IgG y la expresión de IL-21 se incrementa en el modelo de ratón BXSB-Yaa que desarrollan una enfermedad similar al lupus eritematoso autoinmune (Ozaki et al, *J. Immunol.* 173: 5361-5371, 2004); la expresión de IL-21 es mayor en los ratones *sarquoque* propensos al lupus (Vinuesa y otros, *Nature* 435: 452, 2005); la expresión de IL-21 es mayor en tejido intestinal inflamado frente a no inflamados de pacientes con enfermedad de Crohn (Monteleone, et al, *Gastroenterology* 128: 687-694, 2005). IL-21 también se produce en exceso en la mucosa de pacientes con enfermedad celíaca (Finn et al *Gut*, PMID: 17965065, 2007).

[00994] 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.

[0095] La presente invención proporciona composiciones y usos de la anticuerpos monoclonales anti-IL21 en enfermedades o afecciones inflamatorias e inmunes, tales como psoriasis, pancreatitis, diabetes tipo I (IDDM), enfermedad de Graves, enfermedad inflamatoria del intestino (EII), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis reactiva, artritis enteropática, espondiloartropatía, miocarditis autoinmune, enfermedad de Kawasaki, enfermedad celíaca, uveítis, enfermedad de Behcet, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad de músculo inflamatorio (polimiositis, dermatomiositis), poliangeítis microscópica, anemia aplásica autoinmune, tiroiditis autoinmune, hepatitis autoinmune, síndrome de Wegener, diverticulosis, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, esclerodermia, esclerosis sistémica, artritis psoriática, osteoartritis, dermatitis atópica, vitiligo, enfermedad injerto contra huésped (EICH), linfoma cutáneo de células T (LCCT), síndrome de Sjogren, glomerulonefritis, nefropatía IgA, nefritis autoinmune, pénfigo vulgar, miastenia gravis, pérdida de audición autoinmune, neuromielitis óptica, síndrome de Goodpasture, crioglobulinemia, síndrome de Guillain Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), rechazo de trasplante, pacientes de trasplante altamente sensibilizados, síndrome anti-fosfolípido, alergia y asma, y otras enfermedades autoinmunes. La presente memoria describe composiciones y usos de anticuerpos monoclonales anti-IL-21 en la terapia de ciertos cánceres de células inmunes, tales como mieloma múltiple, leucemia aguda de células T, o el linfoma de Hodgkin.

Dermatitis de contacto

[0096] 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, 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).

[0097] 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).

[0098] La administración de anticuerpos anti-IL-21 a modelos de ratón de hipersensibilidad de contacto se utiliza para evaluar la utilidad clínica de los anticuerpos anti-IL-21 para mejorar los síntomas y alterar la evolución de la enfermedad.

Dermatitis atópica

[0099] 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 exoriadas, 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.

[0100] 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 Eselectina, una molécula de adhesión inducible sobre el endotelio (revisado en Santamaría-Babi 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).

[0101] 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.

[0102] 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 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.

[0103] La administración de anticuerpos anti-IL-21 a modelos de ratón de dermatitis atópica se utiliza para evaluar la utilidad clínica de los anticuerpos anti-IL-21 para mejorar los síntomas y alterar la evolución de la enfermedad.

Artritis

[0104] 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.

Artritis reumatoide

[0105] 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 reumatoideas. 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 TNFalfa 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).

[0106] 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 (por ejemplo, hipersensibilidad de tipo retardado y anticuerpo anticolágeno) e inflamatorios (por ejemplo, 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).

[0107] La administración de anticuerpos anti-IL-21 a estos ratones del modelo AIC se utiliza para evaluar el uso de anticuerpos anti-IL-21 para mejorar los síntomas y alterar la evolución de la enfermedad.

Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII)

[0108] 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 ulcerosa), 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 ulcerosa (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 "no propias" (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 ulcerosa 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.

[0109] 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 (por ejemplo, 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.

[0110] Existen varios modelos animales que pueden imitar parcialmente la colitis ulcerosa 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). La transferencia adoptiva de células T sin tratar en ratones desparejados de histocompatibilidad menor o inmunocomprometidos singénicos conduce al desarrollo de colitis (Leach MW et al 1996, Powrie F et al, 1997), así como lesiones en la piel que se asemejan psoriasis (Schon MP et al., Nat Med. 2: 183-8, 1997; Davenport CM et al, Int Immunopharmacol 5: 653-72, 2002). El trasplante de tan sólo 0,2 millones de células T CD4+ CD25- de ratones BALB/C o B10.D2 en ratones SCID C.B-17 inmunocomprometidos da lugar a la pérdida de peso, heces positivo en Hemocult y el desarrollo de lesiones de la piel. Los síntomas en estos ratones varían de una colonia a otra. Este modelo de colitis/psoriasis tiene algunas similitudes con la enfermedad de Crohn y la psoriasis humana, y se ha utilizado ampliamente para probar la eficacia de los agentes terapéuticos para estas enfermedades en seres humanos.

[0111] 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 y su 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.

[0112] Se puede utilizar la administración de anticuerpos anti-IL-21 a estos modelos de transferencia TNBS, DSS o células T 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

[0113] 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 se altera la diferenciación terminal de los queratinocitos. 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 implica la activación de células T, presentación de antígenos alterada y producción de citosinas por células dendríticas inflamatorias y la inflamación crónica a 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.

[0114] 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).

[0115] 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, Cattani 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). 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.

[0116] 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^oCde 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.

[0117] La administración de anticuerpos anti-IL-21 a estos ratones modelo con psoriasis se utiliza para evaluar la utilización de anticuerpo anti-IL-21 para mejorar los síntomas y alterar la evolución de la enfermedad.

Lupus eritematoso sistémico

[0118] 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, aunque en algunos casos puede dar lugar la glomerulonefritis (es decir, lupus nefritis). Se han asociado con la enfermedad de 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).

[0119] Se ha sido observado convincentemente que IL-21 induce la diferenciación de células B humanas sin tratar en células plasmáticas secretoras de anticuerpos (Ozaki et al, J. Immunol 173: 5361, 2004; Ettinger et al, J Immunol 175: 7867-79, 2005; Ettinger et al, J Immunol 178: 2872-82, 2007; Kuchen et al J Immunol 179: 5886-96, 2007). (Ozaki et al, (J. Immunol. 173: 5361, 2004) también demostró que la expresión de IL-21 es elevada en ratones BXSB-Yaa propensos al lupus, un modelo para LES, a una edad cuando las primeras características de los procesos autoinmunes resultan evidentes. El tratamiento de estos ratones BXSB-Yaa con un antagonista de IL-21 murino inhibe parcialmente diversos parámetros de la enfermedad, incluyendo la glomerulonefritis (Bubier et al, Ann NY Acad Sci 1110: 590-601, 2007). El mismo antagonista de IL-21 también ha demostrado ser eficaz en otro modelo de la enfermedad pre-clínica de LES, el ratón MRL//*lpr* (Herber et al J. Immunol. 178: 3822-3830, 2007). Además, dado que IL-21 limita el desarrollo de células Treg, la administración de anticuerpos anti-IL-21 podría proporcionar una función supresora de las células T más robusta en pacientes con lupus donde esta función está comprometida (Lamprecht et al Blood 112 (8): 3339-47, 2008).

[0120] Los datos obtenidos de 24 pacientes con LES y 15 controles sanos mostraron que 1) la expresión de ARNm de IL-21 es significativamente mayor en las células T CD4 + de los pacientes de lupus en comparación con los controles, 2) los niveles de IL-21 son significativamente elevados en los sueros de pacientes con LES activo en comparación con LES inactivo o controles, tal como se determina utilizando un kit ELISA de IL-21 comercial (Invitrogen, Carlsbad, CA), 3) IL-21 aumenta la proliferación de células T CD4+ y células B CD19+ en pacientes y se controla de una manera dependiente de la dosis, 4) IL-21 aumenta la diferenciación de células plasmáticas inducidas por anti-CD40 en los controles normales y pacientes con LES, y 5) los niveles elevados de IL-21 pueden contribuir a la proliferación de células T CD4+ autorreactivas y la diferenciación de células plasmáticas en LES ((Rus, V., ACR Presentation # 1760, 2008 del reunión del colegio americano de reumatología, 24-29 de octubre de 2008).

[0121] Los anticuerpos anti-IL-21 se pueden administrar en combinación con otros agentes que ya están en uso en la autoinmunidad incluyendo moduladores inmunes, tales como IFN γ , NOVANTRONE®, ENBREL®, BETA FERON®, REMICADE®, LEUKINE® y PROLEUKIN®. Los anticuerpos anti-IL-21 se pueden administrar en combinación con otros agentes que ya están en uso en la terapia del cáncer de mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin o leucemia aguda de células T, tales como THALOMID® o con esteroides, tales como la dexametasona o prednisona. Establecer el nivel de dosis óptima y la programación para los anticuerpos anti-IL-21 se realiza mediante una variedad de medios, incluyendo el estudio de la farmacocinética y la farmacodinámica de anticuerpos anti-IL-21; determinación de las dosis eficaces en animales modelos, y la evaluación de la toxicidad de los anticuerpos anti-IL-21. Las mediciones farmacocinéticas directas realizadas en primates y ensayos clínicos pueden ser usados para predecir las dosis teóricas en pacientes que logran los niveles de anticuerpos anti-IL-21 en plasma que son de magnitud suficiente y duración para lograr una respuesta biológica en los pacientes.

Rechazo del trasplante

[0122] Los receptores de órganos sólidos trasplantados pueden desarrollar rechazo agudo o crónico del aloinjerto debido a la falta de coincidencia de histocompatibilidad. La generación de anticuerpos dirigidos contra las moléculas de HLA (aloanticuerpos) en estos pacientes resulta de la presentación del antígeno extraño a las células T. Los aloanticuerpos pueden mediar el daño tisular en el injerto a través de la formación de complejos inmunes, la fijación del complemento, y la citotoxicidad celular mediada por anticuerpo dirigida por aloanticuerpos unidos. La cascada del complemento también libera factores locales que activan las células endoteliales y causan vasculopatía dentro del injerto. El producto de complemento C4d es un marcador temprano en el rechazo agudo y crónico de trasplantes, y se puede detectar en los casos subclínicos antes de manifestar cambios patológicos (Racusen y Haas, Clin J Am

Soc Nephrol 1: 415-420, 2006; Moll y Pascual, Am J Trasplante 5: 2611-2618, 2005; Tinkam y Chandraker, Clin J Am Soc Nephrol 1: 404-414, 2006). Los pacientes son examinados para detectar aloanticuerpos anti-HLA (panel de anticuerpos reactivos). Los pacientes pueden ser particularmente sensibles debido a un fallo previo de aloinjerto, transfusiones de sangre, o los embarazos múltiples. La presencia de aloanticuerpos en pacientes con trasplante altamente sensibilizados complica su cuidado, ya que puede ser necesario un aumento de las terapias inmunosupresoras y las posibilidades de rechazo agudo es alta (Baid y otros, Curr Opin Immunol. 13: 577-581, 2001). En algunos casos, se utilizan agentes de reconocimiento de células B (ácido micofenólico o rituximab), aunque esta estrategia terapéutica no se dirige directamente a las células plasmáticas secretoras de anticuerpos. La plasmaféresis también se usa para reducir la inmunoglobulina circulante. En todos los casos, los receptores de trasplante se tratan con agentes inmunosupresores dirigidos a células T para reducir el riesgo de rechazo, y puede ser lentamente "destetado" de estos regímenes a medida que se establece tolerancia al injerto (Seyfort-Margolis y Turka, J Clin Invest 118 (8): 2684-2685, 2008; Taylor y otros, Crit Rev Oncol Hematol. 56: 23-46, 2005; Amante y Ejercito, Transplant Proc 40: 2274-2280, 2008).

[0123] El desarrollo de las células plasmáticas secretoras de anticuerpos requiere de la ayuda afín de células T CD4 además de microambientes especializados que soportan la supervivencia de células plasmáticas (Tarlington et al, Curr Opin Immunol. 20: 162-169, 2008). La secreción de citoquinas por las células T activadas es necesaria para la diferenciación y la supervivencia de las células plasmáticas, y se sabe que afecta a la naturaleza de la respuesta de anticuerpos y de isotipo de Ig. Existen modelos para monitorear las respuestas de anticuerpos dependientes de células T en murinos y especies de primates no humanos. Estos métodos se conocen bien por los expertos en la técnica. La cinética y magnitud de las respuestas de anticuerpos primarios o secundarios contra antígenos de péptidos modelo, tales como la ovoalbúmina, toxoide del tétanos, glóbulos rojos de oveja, o hemocianina de lapa californiana modificada con trinitrofenilo se controla por medio de ensayos que detectan anticuerpos totales o específicos de antígeno, incluyendo subtipos IgG, IgM, IgE, IgA o en el suero de los animales tratados. En algunos modelos, la maduración de afinidad de los anticuerpos también se puede controlar. Estos modelos pueden ser utilizados para probar los efectos de los fármacos terapéuticos que alteran la ayuda de células B por las células T y que bloquean las citoquinas que se consideran importantes para la diferenciación y supervivencia de células plasmáticas.

[0124] Los estudios de rechazo del aloinjerto se llevan a cabo en muchas especies animales. Por ejemplo, un modelo de trasplante renal en monos cynomolgus puede representar los efectos del rechazo crónico de aloinjerto renal mediado por aloanticuerpos en seres humanos. Los regímenes de aloinjerto tolerizantes se llevan a cabo antes del trasplante en algunos casos. La presencia de aloanticuerpos específicos del donante se controla por análisis de citometría de flujo de suero del receptor con leucocitos de sangre periférica no coincidentes, y se detecta la deposición del producto de complemento C4d en biopsias de aloinjerto renal (Smith et al, Am J Transplant 6: 1790-1798, 2006; Smith et al, Am J Transplant 8: 1-11, 2008). Los modelos de trasplante agudo y crónico pueden llevarse a cabo en especies murinas por los expertos en la técnica.

[0125] La administración de anticuerpos anti-IL-21 en un modelo de respuesta de anticuerpos dependiente de células T o un modelo de rechazo de aloinjertos se utiliza para evaluar la utilidad clínica de los anticuerpos anti-IL-21 para reducir respuestas de aloanticuerpos, y mejorar los síntomas de rechazo de aloinjerto, o como parte del régimen terapéutico o tolerizante de pretrasplante para los receptores de trasplante, incluyendo pacientes de trasplante altamente sensibilizados.

[0126] La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 Preparación de proteínas y anticuerpos IL-21

A. Inmunizaciones e hibridomas

[0127] La proteína IL-21 fue producido como se describe en la patente US 7.250.274. Las proteínas receptoras de IL-21 solubles se produjeron como se describe en la solicitud de patente US 2007-0122413 y la patente de Estados Unidos 6.777.539. Los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 se produjeron en ratones de tipo salvaje que generan anticuerpos murinos y en ratones transgénicos que generan anticuerpos totalmente humanos (Medarex, Princeton, NJ). Los ratones se inmunizaron con la proteína IL-21 humana. Brevemente, los ratones se inmunizaron inicialmente por inyección subcutánea con 30 µg de IL-21 recombinante purificada (producida en E. coli en ZymoGenetics) conjugada con BSA (Imject Pharmalink Immunogen Kit, Pierce) y se administra en combinación con CpG (ligando TLR9 murino de oligonucleótido y GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, R & D, Minneapolis, MN) y adyuvante Emulsigen®-P (MVP Laboratories, Inc., Omaha, NE) según las instrucciones del fabricante. Después de la inmunización inicial, cada uno de los ratones recibió tres 30 µg adicionales de IL-21 en adyuvante Emulsigen®-P por vía subcutánea en intervalos semanales. Siete días después de la cuarta inmunización, los ratones fueron sangrados a través del plexo retroorbital y se separó el suero de la sangre para análisis de su capacidad para unirse a IL-21.

[0128] Los esplenocitos se recogieron y se combinaron a partir de dos ratones BALB/c de alto título o ratones transgénicos y se fusionaron con células de mieloma de ratón P3-X63-Ag8.653 utilizando PEG 1450 en un procedimiento de fusión única (proporción 2:1 de fusión, esplenocitos con respecto a células de mieloma, "Antibodies: A Laboratory Manual", E. Harlow y D.Lane, Cold Spring Harbor Press). Tras 9 días de crecimiento después de la fusión, los conjuntos de hibridomas específicos productores de anticuerpos fueron identificados por ELISA directo y ELISA de captura utilizando la proteína IL-21 recombinante, sin etiqueta y etiquetado con Fc de IgG humana, como diana de anticuerpo específico. Los conjuntos de hibridomas positivos se analizaron adicionalmente por su capacidad para bloquear la unión de ligando al receptor, que se mide como el nivel de fosforilación de STAT3 después de la interacción ligando-receptor ("ensayo de neutralización de fósforo-STAT3") de la proteína IL-21 recombinante purificada en células BaF3 que expresan la secuencia del receptor de IL-21. Los anticuerpos monoclonales purificados a partir de medio de cultivo tisular se caracterizaron por su capacidad para bloquear la interacción ligando-receptor ("ensayo de neutralización de fósforo-STAT3") de la IL-21 recombinante purificada en células BaF3 que expresan las secuencias del receptor. De esta manera se identificaron anticuerpos monoclonales "neutralizantes".

[0129] Los conjuntos de hibridomas que producen resultados positivos por el "ensayo de neutralización de fósforo-STAT3" y formatos de ELISA se clonaron al menos dos veces por dilución limitante. En estos ensayos, las muestras se titularon mediante dilución de baja densidad estándar (menos de una célula por pocillo) para ver qué clon mantendrá la lectura más alta de DO. Utilizando los resultados de los ensayos de neutralización y de valoración, se seleccionaron dos clones específicos de cada pocillo madre inicial para su posterior análisis. Estos se someten a una ronda adicional de clonación para asegurar la homogeneidad de cultivo y se seleccionaron usando el ELISA directo. Después de un ensayo de valoración adicional, se seleccionaron dos clones de IL-21 finales. Los clones de hibridoma se cultivaron en un medio de crecimiento de medio de Dulbecco modificado por Iscove al 90% con 2 mM L-glutamina, 100 µg/ml de penicilina, y 100 µg/ml sulfato de estreptomina, y 10% suero clon fetal (Hyclone Laboratories). Los clones se propagaron mediante la siembra de los cultivos a 2×10^5 células/ml y manteniendo entre 1×10^5 y 5×10^5 células/ml a 37°C y 5-6% de CO₂. Las células se adaptaron a las condiciones libres de suero tras las transferencias posteriores. Las células se congelan en 90% de suero, 10% de DMSO y se almacenan en fase vapor de un congelador de nitrógeno líquido.

[0130] Los anticuerpos monoclonales purificados producidos por los clones de hibridoma se caracterizaron en un número de maneras, incluyendo binning (es decir, la determinación de si cada anticuerpo podría inhibir la unión de cualquier otro anticuerpo), el mapeo de epítopes usando péptidos, afinidad relativa, y la neutralización.

[0131] Se conocen métodos para producir anticuerpos heterólogos de ratones transgénicos, véase, por ejemplo, Lonberg, Nat. Biotech. 23 (9): 1117-1125, 2005; Tomizuka et al. PNAS 97 (2): 722-727, 2000; y la patente de Estados Unidos 5.625.126.

[0132] Los siguientes hibridomas que producen anticuerpos monoclonales IL-21 anti-humanos murinos se han depositado en la American Type Culture Collection, Manassas, VA. Clon 338.5.4 ATCC No. (PTA-8317), clon 338.11.5 ATCC No (PTA-8314), clon 338.14.3 ATCC No. (PTA-8313), clon 338.15.5 ATCC No. (PTA-8315), clon 338.17.3 ATCC No. (PTA-8316), clon 338.24.5 ATCC No. (PTA-8430), clon 338.25.6 ATCC No. (PTA-8431), clon 338.39.5 ATCC No. (PTA -8432), clon 338.29.2 ATCC N° (PTA-8433), clon 338.28.6 ATCC N° (PTA-8434).

[0133] Los siguientes hibridomas que producen anticuerpos monoclonales anti-IL-21 humanas de humanos se han depositado en la American Type Culture Collection, Manassas, VA. La Tabla 1 proporciona las secuencias de aminoácidos completas para las cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) de los anticuerpos. También se incluyen las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de regiones VH y VL de cada anticuerpo. Las secuencias de nucleótidos correspondientes se encuentran en la lista de secuencias. Incluido en el depósito, pero no en la Tabla 1, es un hibridoma designado 366.345.6.11, ATCC N° PTA-8788.

Tabla 1

Número de clon	ATCC No.	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	Secuencia completa
362.75.1. 1.7	PTA-8791	SRTYR WG SEQ ID NO: 15	SIYRG STFYNP SLKS SEQ ID NO: 17	QSGYS GYDWF DP SEQ ID NO: 19	RASQS VSSFLA SEQ ID NO: 23	DASNR AT SEQ ID NO: 25	QQRSN WIT SEQ ID NO: 27	VH MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQLQEQSGPGLVKPSETLSL TCTVSGGSISSRTYRWGWIRQPPGKELEWIGSIYYRGSTF YNPSLKSRVTVSDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR QSGYSGYDWFDPWGQGLVTVSS SEQ ID NO: 13
362.78.1. 44	PTA-8790	SYGMH SEQ ID NO: 31	FIWYD GSDKY YADSV KG SEQ ID NO: 33	DGDSS DWYGD YYFGM DV SEQ ID NO: 35	RASQS VSSSYL A SEQ ID NO: 39	GASSR AT SEQ ID NO: 41	QQYGS WT SEQ ID NO: 43	VU MEAPAQLLLLLWL P DTTG EIVL TQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSFLA WYQQKPGQAPRLIYDASNRAATGIP ARFSGSGS GDTFTL TISSLEPEDFAVYYCQQRSNWITFGQ GTRLEIK SEQ ID NO: 21
362.597. 3.15	PTA-8786	TYGMH SEQ ID NO: 47	FIWYD GSDKY YADSV KG SEQ ID NO: 49	DGDSS DWYGD YYFGM DV SEQ ID NO: 51	RASQS VSSSYL A SEQ ID NO: 55	GASSR AT SEQ ID NO: 57	QQYGS WT SEQ ID NO: 59	VH MEFGLSWVFLVALLRGRVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLR LSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLWVAFIWIYDGS DKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARDGSDSDWYGDYYFGMDVWVGQTTVTVSS SEQ ID NO: 37

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continuación)

Número de clon	ATCC No.	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	Secuencia completa
366.328. 10.63	PTA-8789	SYSMN SEQ ID NO: 63	SITSGS YYIH ADSVK G SEQ ID NO: 65	ERGWG YYGMD V SEQ ID NO: 67	RASQDI DSALA SEQ ID NO: 71	DASSLE S SEQ ID NO: 73	QQFNS YPYT SEQ ID NO: 75	VL METPAQLLFLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSPGERAT LSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSWTFGQ GTKVEIK SEQ ID NO: 53
366.552. 11.31	PTA-8787	SDFWG SEQ ID NO: 79	YISSRG STNYN-PSLKR SEQ ID NO: 81	SAGVT DFDF SEQ ID NO: 83	RASQGI SSWLA SEQ ID NO: 87	VASSLQ S SEQ ID NO: 89	QQANS FPLT SEQ ID NO: 91	VL MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGD RVTTICRASQDIDSALA WYQQKPGKAPKILIHDAASSLESG VPSRFSGSGGTDFTLTITSSLQPEDFATYYCQQFNSTPPTF GQGTKLEIK SEQ ID NO: 69
								VH MKHLWFFLLVAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPKSETLS LTCTVSGGSISSDFWGWIRPPGKGLEWIGYISSRGTNY NPSLKRRTVTSVDSRNQFSLKLSVTAADTAVYYCARS AGVTDFDFWGGGTLVTVSS SEQ ID NO: 77

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

(continuación)

Número de clon	ATCC No.	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3	Secuencia completa
								<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">VL</div> <p> MDMMVPAQLLGLLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSA SVG DRVTTCRASQGISSWLA WYQHKPGKAPKLLIYVASSLQ SGVPSRFRSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPL TFGGGTKVEIK SEQ ID NO:85 </p>

1B: Expresión del clon 362.78.1.44 inmunoglobulina, genes de cadena pesada y ligera en una línea de células de mamífero para producir 362.78-CHO

[0134] El anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana (derivado de clon de hibridoma 362.78.1.44) se expresó en células CHO utilizando dos casetes de expresión. La cadena VH se fusionó a una región constante de IgG1 humana modificada. La IgG1 modificada, IgG1.1, contenía cinco sustituciones de aminoácidos para reducir las funciones efectoras. La cadena pesada de anti-IL-21 humana de humano se unió a un marcador seleccionable de dihidrofolato reductasa (DHFR) con una secuencia de sitio interno de entrada ribosomal (IRES). La expresión de la cadena pesada de anti-IL-21 humana de humano y el marcador seleccionable de DHFR se dirigieron por un promotor sintético constitutivo que consiste en una fusión del promotor de citomegalovirus humano (CMV) y el potenciador/promotor del virus del sarcoma mieloproliferativo (MPSV). La señal de poliadenilación del virus 40 (SV40) de simio se utilizó para terminar la transcripción en el extremo del marcador seleccionable de DHFR. La cadena VL se fusionó a la región constante kappa de inmunoglobulina humana. La cadena ligera de anti-IL-21 humana de humano se unió a un marcador seleccionable con resistencia a la puomicina (puroR) con una secuencia IRES. La expresión de la cadena ligera de anti-IL-21 humana de humano y el marcador seleccionable de puroR fue dirigida por un promotor sintético constitutivo que consiste en una fusión del promotor de CMV humano y el potenciador/promotor de MPSV. La señal de poliadenilación SV40 se utilizó para terminar la transcripción en el extremo del marcador seleccionable puroR. Los casetes de expresión de cadena pesada y ligera de anti-IL-21 humana se cotransfectaron en células huésped CHO DXB-11. La selección de puomicina fue seguida por selección con metotrexato para obtener la expresión alta y estable de anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana. La versión expresada por CHO del clon de mA b de IL-21362.78.1.44 se referirá en los ejemplos posteriores como "362.78-CHO."

Ejemplo 2-Anticuerpos monoclonales anti-IL-21 se unen a proteínas y péptidos IL-21

2A. Unión y neutralización de péptidos

[0135] La capacidad de anticuerpos monoclonales de unión y neutralizantes anti-IL-21 humana para unirse a IL-21 humana, proteína IL-21 humana mutante, y péptidos sintéticos derivados de la secuencia de IL-21 humana se demostró en el formato de ensayo de ELISA directo.

[0136] Se utilizaron los siguientes péptidos:

péptido # 1 ((SEQ ID NO: 3) piroGlu GQDRHMIRMRLIDIVDQLKC;

péptido # 2 ((SEQ ID NO: 4) NDLVPEFLPAPEDVETNC,

péptido # 3 ((SEQ ID NO: 5) NVSIKLLKRKPPSTNAGRRQKHRLTC,

péptido # 4 ((SEQ ID NO: 6) y CDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLS

[0137] La IL-21 recombinante humana (SEQ ID NO: 2), péptidos sintéticos derivados de la secuencia de IL-21 humana; y IL-21 recombinante mutante humana (SEQ ID NO: 7) se inmovilizaron por separado sobre la superficie de placas ELISA de poliestireno de 96 pocillos en un volumen de 100 µl/pocillo a una concentración de 1 µg/ml en tampón de Recubrimiento (0,1 M Na₂CO₃, pH 9,6). Las placas se incubaron durante la noche a 4°C, después de lo cual se aspiró la proteína no unida y se lavaron las placas dos veces con 300 µl/pocillo de tampón de lavado (PBS-Tween definido como 0,137M NaCl, 0,0022M KCl, 0,0067M Na₂HPO₄, 0,0020 M KH₂ PO₄, 0,05% v/p polisorbato 20, pH 7,2). Los pocillos se bloquearon con 200 µl /pocillo de tampón de bloqueo (PBS-Tween, más 1% p/v albúmina de suero bovino (BSA)) durante 1 hora, después de lo cual las placas se lavaron dos veces con tampón de lavado. Las diluciones de anticuerpos se prepararon de 5% de suero bovino fetal (FBS)/medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) y se ajustaron a 1 µg/ml. Las muestras duplicadas de cada dilución de anticuerpo se transfirieron entonces a las placas de ensayo, 100 µl/pocillo, a fin de unirse a las proteínas anti-IL-21. Después de la incubación de 1 hora a temperatura ambiente, los pocillos se aspiraron y las placas se lavaron dos veces como se describe anteriormente. A continuación, se añadió a cada pocillo, 100 µl/pocillo, IgG anti-ratón de cabra, Fc específico, o IgG anti-rata de cabra, Fc específico, o IgG anti-humano de cabra, Fc específico, conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) a una dilución de 1:5000 con medio al 5% de FBS/IMDM a cada pocillo, y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la extracción del anticuerpo conjugado a HRP no unido, las placas se lavaron cinco veces, se añadieron 100 µl/pocillo de tetrametil bencidina (TMB) (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. El revelado de color se detuvo mediante la adición de 100 µl/pocillo de reactivo de parada TMB a 450 nm (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y los valores de absorbancia de los pocillos se leyeron en un instrumento de Molecular Devices Spectra MAX 340 a 450 nm.

Tabla 2

Reactividad del anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana de ratón a la proteína IL-21 humana, proteína IL-21 humana mutante y péptidos derivados de la secuencia de IL-21 humana								
Ab anti-IL-21 humana de	Unión (B) Neutralizante	Ab purificado	IL-21	Péptido 1	Péptido 2	Péptido 3	Péptido 4	Mutante de IL-21

ES 2 584 237 T3

ratón Clon #	(N) Isotipo	Lote#						
338.5.4	B/N IgG1	E10274	+/-	0	0	0	0	+/-
338.11.5	B IgG1	E10276	+++	0	+++	0	0	+++
338.14.3	B IgG1	E10273	+/-	0	0	0	0	0
338.15.5	B IgG1	E10275	+++	0	0	0	+++	0
338.28.6	B IgG1	E10329	+++	0	0	0	0	+
339.39.5	B IgG1	E10330	+++	0	0	+++	0	+++
Reactividad:		Ninguna (0)	Débil (+)	Moderada (++)	Fuerte (+++)			

Tabla 3

Reactividad del anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana de ratón a la proteína IL-21 humana, proteína IL-21 humana mutante y péptidos derivados de la secuencia de IL-21 humana								
Ab anti-IL-21 humana de ratón Clon #	Unión (B) Neutralizante (N) Isotipo	Ab purificado Lote#	IL-21	Péptido 1	Péptido 2	Péptido 3	Péptido 4 C-term	Mutante de IL-21
362.75.1.1	B/N IgG	E10364	+++	0	0	0	+++	0
362.78.1.44	B/N IgG	E10554	++	0	0	0	0	+
362.597.3	B/N IgG	E10336	+++	0	0	0	0	++
366.328.10	B/N IgG	E10416	+++	0	0	0	0	+++
366.345.6.11	B IgG	E10476	+++	0	0	0	0	++
366.552.11	B/N IgG	E10435	+++	0	0	0	++	0
Reactividad:		Ninguna (0)	Débil (+)	Moderada (++)			Fuerte (+++)	

5 2B Medición de las afinidades de unión de anticuerpo monoclonal anti-IL-21 362.78-CHO a IL-21 humana e IL-21 de mono cynomolgus por resonancia de plasmón superficial (Biacore)

[0138] El anticuerpo monoclonal anti-IL-21 362.78-CHO se evaluó por su afinidad de unión a IL-21 recombinante humana y IL-21 recombinante de cynomolgus utilizando resonancia de plasmón superficial.

10 **[0139]** Determinación de afinidad: se midieron las constantes de velocidad cinética y las constantes de equilibrio de disociación para la interacción del anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana 362.78-CHO con IL-21 humana y IL-21 de cynomolgus a través de resonancia de plasmón superficial. La constante de velocidad de asociación (k_a ($M^{-1}s^{-1}$)) es un valor que refleja la velocidad de la formación del complejo antígeno-anticuerpo. La constante de velocidad de

disociación (k_d (s^{-1})) es un valor que refleja la estabilidad de este complejo. Al dividir la constante de velocidad de disociación por la constante de velocidad de asociación (k_d/k_a) se obtiene la constante de equilibrio de disociación (K_D (M)). Este valor describe la afinidad de unión de la interacción. Los anticuerpos con K_D similares pueden tener constantes de velocidad de asociación y disociación muy variables. En consecuencia, la medición de k_a y k_d de anticuerpos ayuda a describir de forma más exclusiva la afinidad de la interacción anticuerpo-antígeno.

[0140] Materiales y métodos: Se realizaron estudios de cinética de unión y afinidad en un sistema Biacore T100® (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los métodos para la Biacore T100® se programaron utilizando BIACORE T100® Software de Control, v 1.1.1. Para estos experimentos, el anticuerpo 362.78-CHO fue capturado sobre un chip sensor CM4 a través de un anticuerpo IgG Fc-gamma de cabra anti-humano (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), o se biotiniló mínimamente con una relación de masas 1:100 de sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce, Rockford, IL) en un tampón de PBS pH 7,4 y a continuación se capturó sobre un chip de estreptavidina (SA) Todos los experimentos de unión se realizaron a 25°C en un tampón de HEPES 10 mM, NaCl 300 mM, 5 mM $CaCl_2$, 0,05% tensoactivo P20 (Biacore), 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, pH 8,0.

[0141] Para los experimentos con el anticuerpo IgG1Fc-gamma de cabra anti-humano, el anticuerpo de captura se diluyó a la concentración de 50 μ g/ml en 10 mM de acetato de sodio pH 5,0, y a continuación se inmovilizó covalentemente a las cuatro celdas de flujo de un chip sensor CM4 usando química de acoplamiento de amina (EDC:NHS). Después de la inmovilización del anticuerpo, los sitios activos restantes en la celda de flujo se bloquearon con 1 M de etanolamina. Se obtuvo una densidad de anticuerpo de captura de aproximadamente 3500 RU. El anticuerpo anti-IL-21 362.78-CHO fue capturado en la celda de flujo 2, 3, y 4 del chip CM4 a tres densidades diferentes (que van desde 25 hasta 150 RU). La captura del anticuerpo 362.78-CHO en la superficie inmovilizada se realizó a una velocidad de flujo de 10 μ l/min. El instrumento Biacore mide la masa de proteína unida a la superficie del chip sensor, y por lo tanto, se verificó la captura del anticuerpo de prueba para cada ciclo. Se prepararon diluciones en serie de IL-21 recombinante humano o IL-21 recombinante de cynomolgus (ZymoGenetics) a partir de 40 nM - 0,003 nM (diluciones en serie 1:5). Las diluciones en serie se inyectaron sobre la superficie y se dejó que se unieran específicamente al anticuerpo 362.78-CHO capturado en el chip sensor. Se realizaron inyecciones duplicadas de cada concentración de antígeno IL-21 con un tiempo de asociación de 6,5 ó 7 minutos y el tiempo de disociación de 10, 15, o 60 minutos. Se llevaron a cabo estudios de unión cinéticos con un flujo de 50 μ l/min. Entre los ciclos, la celda de flujo se lavó con ácido clorhídrico 20 mM para regenerar la superficie. Esta etapa de lavado eliminó tanto el anticuerpo de prueba capturado como cualquier antígeno unido de la superficie de anticuerpo inmovilizado. El anticuerpo 362.78-CHO fue capturado posteriormente de nuevo en el siguiente ciclo.

[0142] Para los experimentos con 362.78-CHO mínimamente biotinilado, el anticuerpo biotinilado se capturó en la celda de flujo 2, 3, y 4 del chip SA a tres densidades diferentes (que van desde 150 hasta 1200 RU). La captura del anticuerpo 362.78-CHO biotinilado a la superficie se realizó a una velocidad de flujo de 10 μ l/min. Se prepararon diluciones en serie de IL-21 recombinante humano o IL-21 recombinante de cynomolgus (ZymoGenetics) a 50 nM - 0,001 nM (diluciones en serie 1:4) o 40 nM-0,003 nM (diluciones en serie 1:5). Estas diluciones en serie se inyectaron sobre la superficie y se dejó que se uniera específicamente al anticuerpo 362.78-CHO capturado en el chip sensor. Las inyecciones por duplicado de cada concentración de antígeno de IL-21 se llevaron a cabo con un tiempo de asociación de 6,5 ó 7 minutos y un tiempo de disociación de 10, 15, o 60 minutos. Se llevaron a cabo estudios de unión cinéticos con un flujo de 50 μ l/min. Entre los ciclos, la celda de flujo se lavó con ácido clorhídrico 20 mM para regenerar la superficie. Esta etapa de lavado eliminó cualquier antígeno unido de la superficie de anticuerpo inmovilizado. El ciclo de lavado no eliminó el anticuerpo 362.78-CHO biotinilado de la superficie del sensor, y el anticuerpo estaba posteriormente disponible para unirse a la siguiente muestra de antígeno.

[0143] Los datos se compiló usando el software Evaluación de BIACORE T100® (versión 1.1.1). Los datos se procesaron restando las inyecciones de la celda de flujo de referencia y inyecciones de blanco. La estabilidad de línea de base se evaluó para asegurar que la etapa de regeneración proporcionaba una superficie de unión consistente a lo largo de la secuencia de inyecciones. Las curvas de inyección por duplicado se comprobaron por su reproducibilidad. En base a la unión del IL-21 monovalente a un anticuerpo bivalente, el modelo de interacción de unión 1:1 se determinó que era apropiado. Las curvas de unión con la referencia restada de tres celdas de (FC2-1, FC3-1, FC4-1) fueron globalmente ajustadas al modelo de unión 1:1 con un R_{max} múltiple y con la RI a cero. Los datos se ajustan bien al modelo de unión 1:1 con buena concordancia entre las curvas de unión experimental y teórica. Los errores χ^2 y estándar asociados a los ajustes fueron bajos. No hubo ninguna tendencia en los residuos.

[0144] Resultados: Para la interacción de 362.78-CHO con IL-21 humana, los datos se compilaron a partir de cuatro experimentos separados. La k_a de los múltiples experimentos varió de $3E+07$ a $5+07$ ($M^{-1}s^{-1}$), mientras que la k_d varió de $3E-06$ a $3E-05$ (s^{-1}). La K_D calculada varió de $0,9E-13$ a $8E-13$ (M).

[0145] Para la interacción de 362.78-CHO con IL-21 de cynomolgus, los datos se compilaron a partir de tres experimentos separados. La k_a era $3E+07$ ($M^{-1}s^{-1}$) para cada experimento, mientras que la k_d varió de $2E-04$ a $5E-04$ (s^{-1}). La K_D calculada varió de $0,9E-11$ a $2E-11$ (M).

Ejemplo 3 Experimentos de reactividad cruzada de especies

[0146] Determinación de la capacidad de anticuerpos anti-IL-21 humana a reacción cruzada y unión a proteína de IL-21 murino o de mono cynomolgus o péptidos sintéticos derivados de secuencia de IL-21 humana.

- 5 **[0147]** Los estudios de reactividad cruzada de especies pueden ser importantes para demostrar la especificidad de las estrategias de desarrollo de antagonistas terapéuticos. Con el fin de determinar si los elementos de unión y neutralización de anti-IL-21 humana descritas en este documento pueden reaccionar de forma cruzada y unirse a IL-21 murino o de Cynomolgus (y por lo tanto, justificar el mono cynomolgus o ratón como una especie de ensayo viables), era necesario demostrar la unión comparable de los anticuerpos frente a IL-21 recombinante humano, murino y de mono cynomolgus en los diversos formatos de ensayo. Uno de los métodos para ensayos de unión de los anticuerpos monoclonales es por su rendimiento en los ensayos de inmunotransferencia (transferencia Western). La IL-21 recombinante humana (SEQ ID NO: 2), IL-21 recombinante murina (SEQ ID NO: 11), IL-21 recombinante de cynomolgus (SEQ ID NO: 9), péptidos sintéticos derivados de la secuencia de IL-21: péptido # 1 pyr30-K50 (SEQ ID NO: 3), péptido # 2 N54-C71 (SEQ ID NO: 4), péptido # 3 N97-C122 (SEQ ID NO: 5), péptido # 4 C125-S153 (SEQ ID NO: 6) conjugado a ovoalbúmina, o una citoquina control irrelevante, IFN-λ recombinante humana (ZymoGenetics) se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) utilizando geles de poliacrilamida 4-12% BisTris (Invitrogen, Inc.) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando métodos estándar y un tampón que contenía Tris 25 mM, glicina 186 mM y 40% de metanol.
- 20 **[0148]** Para las transferencias Western, los sitios no específicos en las membranas se bloquearon con un tampón que contiene Tris 20 mM, pH 7,4, EDTA 0,5 mM, Igepal CA-630 al 0,5%, NaCl 150 mM, gelatina al 0,25%, y solución de bloqueo hidrolizado de caseína al 1% (reactivo de bloqueo Western, Roche Diagnostics, Inc., Basilea Suiza) (tampón de bloqueo). Las membranas se incubaron a continuación durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal purificado (10 ng/ml o 100 ng/ml) en el tampón de bloqueo seguido por una incubación de 2 h con anti-IgG humana de burro conjugada con peroxidasa (Jackson Laboratories, Bar Harbor, YO). Las membranas se lavaron 5 veces con el tampón de bloqueo Tris/EDTA/IGEPAL/NaCl/gelatina que carecía de hidrolizado de caseína y se reveló con solución de luminol/potenciador/peroxidasa SUPERSIGNAL® DuraWest (Pierce, Rockford, IL) para la detección de quimioluminiscencia. Las transferencias se visualizaron utilizando métodos estándar en base a películas de rayos X.

30

Tabla 4

Reactividad de anticuerpos monoclonales humanos anti-IL-21 humana en análisis de transferencia Western								
Clon*	IL-21 hu	IL-21 cyno	IL-21 mu		Péptido IL-21 +hu A1744	Péptido IL-21 +hu A1750	Péptido IL-21 +hu A1751	Péptido IL-21 +hu A1752
362.35.1.2	0	0	0		0	0	0	0
362.37.3	+++	+++	+++		0	0	0	0
362.75.1.1	+++	+++	+++		0	0	0	+++
362.78.1	++	++	0		0	0	0	0
362.108.1.2	0	0	0		0	0	0	0
362.172.2	+++	+++	+++		0	0	0	0
362.216.2	0	+/-	0		0	0	0	0
362.256.1	0	0	0		0	0	0	0
362.303.1.1	0	0	0		0	0	0	0
362.378.1	+++	+++	+++		0	0	0	+
362.468.3	+/-	+	0		0	0	0	0
362.564.1.4	++	++	0		0	0	0	0
362.597.3	++	++	+/-		0	0	0	0
362.632.2	+++	+++	+++		0	0	0	+++
366.328.10	+	+	0		0	0	0	0
366.342.8	+++	+++	+++		0	0	0	0
366.345.6.1	0	0	0		0	0	0	0
366.353.11.12	+	++	0		0	0	0	0
366.398.36	+++	+++	+++		0	0	0	0
366.453.30	+++	+++	+++		0	0	0	0
366.462.24.10	+++	+++	+++		0	0	0	0
366.479.13	+++	+++	+++		0	0	0	0
366.552.11	+++	+++	+++		0	0	0	0
366.565.7	0	0	0		0	0	0	0
366.617.7	+++	+++	+++		0	0	0	0
366.618.20	++	++	+		0	0	0	0
367.752.5	+++	+++	+++		0	0	0	0
368.626.24	+++	+++	++		0	0	0	0

Reactividad: Ninguna (0)	Ninguna (0)	Débil (+)	Moderada (++)	Intensa (+++)	* No se observaron señales con IFN-λ + Péptidos conjugados a ovalbúmina
-----------------------------	----------------	-----------	------------------	---------------	--

Ejemplo 4 Evaluación de la capacidad de anticuerpos anti-IL-21 humana para reaccionar de forma cruzada y unirse a citosinas de la familia γ c humana IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15

- 5 **[0149]** Otra característica importante de un anticuerpo específico es la capacidad del anticuerpo para unirse a y antagonizar la proteína o proteínas diana, pero no unirse a proteínas relacionadas (no diana) en un grado significativo. La capacidad de los anticuerpos anti-IL-21 humana de unirse a citoquinas relacionadas se puso a prueba en el formato de transferencia de Western. Se obtuvieron muestras de todos los miembros de la familia de citoquinas γ c y se ejecutaron en SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para la transferencia.
- 10 Se usaron IL-2 humana (202-IL/CF), IL-4 humano (204-IL/CF), IL-7 humana (207-IL/CF), IL-9 humana (209-IL/CF), IL-15 humana (247-IL/CF), todas obtenidas de R & D Systems, Minneapolis MN), IL-21 humana (ZymoGenetics) y IFN-λ humana recombinantes (Patentes de Estados Unidos 6.927.040; 7.252.969) para evaluar la especificidad de los anticuerpos. Todos los anticuerpos ensayados no mostraron unión detectable por encima del fondo de las citoquinas de la familia γ c, excepto IL-21 humana, donde se observó una unión clara, coherente con las
- 15 transferencias Western anteriores utilizando estos anticuerpos (véase el Ejemplo 3).

Tabla 5:

Reactividad de anticuerpos monoclonales anti-IL-21 humana a citosinas γ c en análisis de transferencia Western							
Clon	IL-2 hu	IL-4 hu	IL-7 hu	IL-9 hu	IL-15 hu	IL-21 hu	Control negativo IFNλ hu
362.597.3	0	0	0	0	0	++	0
362.75.1.1	0	0	0	0	0	+++	0
362.78.1	0	0	0	0	0	+	0
362.564.1.4	0	0	0	0	0	++	0
366.328.10.63	0	0	0	0	0	++	0
366.552.11.31	0	0	0	0	0	+++	0
366.617.7	0	0	0	0	0	+++	0
Reactividad:	Ninguna (0)	débil (+)	moderada (++)	Intensa (+++)			

20

Tabla 6:

Reactividad de anticuerpos monoclonales de ratón y rata anti-IL-21 humana en análisis de transferencia Western								
Clon#	IL-21 hu	IL-21 cyno	IL-21 Mu		Péptido IL-21 +hu A1744	Péptido IL-21 +hu A1750	Péptido IL-21 +hu A1751	Péptido IL-21 +hu A1752
Clones de ratón								
338.5.4	0	0	0		0	0	0	0
338.11.5	+++	+++	+/-		0	+++	0	0
338.14.3	+	+	0		0	0	0	0
338.15.5	+++	+++	++		0	0	0	+++
338.17.3	+++	++	+		0	0	++	0
338.24.5	+++	+	0		0	0	++	0
338.25.6	+++	+++	+++		0	0	0	0
338.28.6	+/-	0	0		0	0	0	0
338.29.2	+++	+++	0		+++	0	0	0
338.39.5	+++	+++	0		0	0	0	0
Clones de rata								
272.19.1.1.4.2	+++	+++	+++		++	0	0	0
272.21.1.3.4.2	+++	+++	+		0	0	0	0
Reactividad:	Ninguna	débil (+)	moderada		Intensa (+++)	*No se	+péptidos se	

	(0)		(++)		observaron señales con IFN-λ	conjugaron con ovalbúmina	
--	-----	--	------	--	------------------------------------	---------------------------------	--

Ejemplo 5 Estudios “binning” de epítomos competitivos

5 **[0150]** Se realizaron experimentos “binning” de epítomo para determinar qué anticuerpos monoclonales anti-IL-21 son capaces de unirse simultáneamente a la IL-21 humana. Se representaron los anticuerpos humanos y de ratón. Los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 que compiten por el mismo sitio de unión (epítomo), o se solapan, en el antígeno no son capaces de unirse simultáneamente y están agrupados funcionalmente en una sola familia o “bin de epítomo”. Los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 que no compiten por el mismo sitio de unión del antígeno son capaces de unirse simultáneamente y se agrupan en familias separadas o “bins de epítomo”. Los experimentos se
10 realizaron utilizando un instrumento BIAcore T100®. Los experimentos de “binning” de epítomo se realizaron con IL-21 humana soluble (ZymoGenetics) como antígeno humano.

15 **[0151]** Se realizaron estudios de “binning” de epítomos en un sistema BIAcore T100® (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los métodos fueron programadas utilizando BIAcore T100® Software de Control, v 1.1.1. Anticuerpos monoclonales anti-IL-21 individuales se inmovilizaron covalentemente a celdas de flujo separadas de un chip sensor BIAcore CM4. Posteriormente, el antígeno de IL-21 se inyectó y se dejó unirse específicamente al anticuerpo monoclonal inmovilizado en el chip sensor. El instrumento BIAcore mide la masa de proteína unida a la superficie del chip sensor, y por lo tanto, se verificó la inmovilización del anticuerpo primario de una pareja de prueba y la unión específica del antígeno de IL-21 con el anticuerpo primario para cada ciclo de ensayo. Después de la unión del
20 antígeno de IL-21, se inyectó un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 secundario y se dejó unirse. Si el anticuerpo monoclonal anti-IL-21 secundario era capaz de unirse al antígeno de manera simultánea con el anticuerpo monoclonal primario, se detectaba un aumento de masa en la superficie del chip, o de unión. Si, sin embargo, el anticuerpo monoclonal anti-IL-21 secundario no era capaz de unirse al antígeno de manera simultánea con el anticuerpo monoclonal primario, no se detectó masa adicional, o unión. Cada anticuerpo monoclonal anti-IL-21 probado contra sí mismo se utilizó como control negativo para establecer el nivel de la señal de fondo (no unión).
25

30 **[0152]** Se completaron una serie de experimentos para probar las propiedades de unión de anticuerpos monoclonales anti-IL-21 purificados obtenidos a partir de fusiones de hibridoma de los bazos de ratones inmunes a la IL-21 humana. El primer anticuerpo monoclonal anti-IL-21 de una pareja de ensayo se inmovilizó covalentemente usando EDC:NHS hasta una densidad de aproximadamente 1000 RU. El antígeno de IL-21 se diluyó hasta 100 nM y se dejó fluir sobre la superficie del anticuerpo inmovilizado. Posteriormente, el anticuerpo secundario de una pareja de prueba se diluyó a 5 µg/ml (aproximadamente 32,2 nM) y se dejó unir al antígeno de IL-21 capturado. Un subconjunto de los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 se ensayó como el anticuerpo primario en combinación con el panel completo de anticuerpos monoclonales anti-IL-21 secundarios. Los experimentos de unión se realizaron con una velocidad de flujo de 30 µl/min a 25°C. El tampón para estos estudios consistía en Hepes 10 mM, NaCl 0,3 M, 0,05% de tensioactivo P20, 5 mM CaCl₂, 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, pH 8,0. Entre los ciclos, el anticuerpo en el chip se regeneró con ácido clorhídrico 20 mM. Los datos se compilaron utilizando BIAcore T100® (software de Evaluación (versión 1.1.1)), a continuación se cargó en EXCEL® para el procesamiento de datos
35 adicionales.
40

45 **[0153]** Los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 purificados se caracterizaron y se asignaron en “bins” de epítomos. La señal (RU, unidades de respuesta) descrita por el BIAcore está directamente correlacionada con la masa sobre la superficie del chip sensor. Una vez establecido el nivel de señal de fondo (RU) asociado con los controles negativos (el mismo anticuerpo monoclonal anti-IL-21 se utiliza tanto como el anticuerpo primario y secundario), se indicaron los resultados de “binning” como positivo o negativo. Unión positiva indica que dos anticuerpos monoclonales anti-IL-21 diferentes son capaces de unirse al antígeno al mismo tiempo. Unión negativa indica que dos anticuerpos monoclonales anti-IL-21 diferentes no son capaces de unirse al antígeno al mismo tiempo. El diferencial entre los valores de respuesta positiva y negativa en este experimento fue significativa y permitió una asignación inequívoca de los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 en seis familias distintas, o “bins” de epítomos. El primer “bin” de epítomo estaba representada por anti-anticuerpos monoclonales IL-21 de, por ejemplo, los clones 338.5.4; 362.78.1; y 362.597.3. El segundo “bin” estaba representado por los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 de, por ejemplo, los clones 338.14.3; 362.75.1.1; y 366.328.10. Se ha encontrado un tercer “bin” adicional para solapar los epítomos de unión de los anticuerpos de bin # 1 y bin # 2. Se representa por el anticuerpo monoclonal de, por ejemplo, el clon 366.552.11. Los anticuerpos que neutralizan IL-21 se encuentran en cada uno de estos tres
50 “bins”.
55

60 **[0154]** Se identificaron tres “bins” de epítomos adicionales. Cada uno de estos “bins” fue representado por el anticuerpo monoclonal de, por ejemplo, los clones de hibridoma 366.345.6.11 (bin # 4), 338.28.6 (bin # 5), y 338.39.5 (bin # 6). Los anticuerpos identificados en estos tres “bins” no neutralizan la bioactividad de IL-21 humana.

Ejemplo 6 - Estudios de competición de los receptores solubles

[0155] Se realizaron experimentos de competición para determinar qué anticuerpos monoclonales anti-IL-21 humana son capaces de unirse a IL-21 simultáneamente con el receptor soluble de IL-21. Los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 humana que compiten con el receptor soluble para el mismo sitio de unión (epítipo), o se solapan, en el antígeno no son capaces de unirse simultáneamente. Los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 que no compiten con el receptor soluble para el mismo sitio de unión en el antígeno son capaces de unirse de forma simultánea. Los experimentos de competición se realizaron con IL-21 humana recombinante soluble como antígeno. El antígeno de IL-21 se dejó unirse al anticuerpo monoclonal antes de la competición con el receptor soluble de IL-21. Se utilizaron dos versiones del receptor soluble de IL-21 (ambos producidos por ZymoGenetics) para el análisis de anticuerpo monoclonal en estos estudios: Una versión del receptor consiste en un receptor homodimérico (IL-21R-Fc) compuesto por el dominio extracelular del receptor de IL-21 fusionado a una molécula de Fc derivada de inmunoglobulina humana. La segunda forma del receptor soluble era un receptor heterodimérico (IL-21R γ -Fc) compuesto de una subunidad que comprende el dominio extracelular del receptor de IL-21 fusionado a una molécula de Fc derivada de inmunoglobulina humana y una segunda subunidad que comprende el dominio extracelular de la cadena γ común fusionada a una molécula de Fc derivada de inmunoglobulina humana, como se describe en la Patente de Estados Unidos 6.777.539 del mismo solicitante.

[0156] Se realizaron estudios de competición en un sistema de BIACORE T100® (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los métodos fueron programados usando el Software de Control de BIACORE T100®, v 1.1.1. Anticuerpos monoclonales anti-IL21 individuales se inmovilizaron covalentemente a células de flujo separadas de un chip sensor BIACORE CM4. Posteriormente, se inyectó el antígeno de IL-21 (SEQ ID NO: 2) y se dejó unir específicamente al anticuerpo monoclonal inmovilizado en el chip sensor. El instrumento de Biacore mide la masa de proteína unida a la superficie del chip sensor, y por lo tanto, se verificó la inmovilización del anticuerpo primario y la unión del antígeno de IL-21 con el anticuerpo primario específico para cada ciclo de ensayo. Después de la unión del antígeno de IL-21, se inyectó el receptor soluble y se dejó unirse. Si el receptor soluble era capaz de unirse al antígeno de manera simultánea con el anticuerpo monoclonal primario, se detectaba un aumento de masa en la superficie del chip, o de unión. Si, sin embargo, el receptor soluble no era capaz de unirse el antígeno de forma simultánea con el anticuerpo primario monoclonal, no se detectaba masa adicional, o unión. Cada anticuerpo monoclonal anti-IL-21 probado contra sí mismo se utilizó como control negativo para establecer el nivel de la señal de fondo (no unión). Como control positivo, cada anticuerpo monoclonal anti-IL-21 se ensayó frente a un anticuerpo anti-IL-21 de un "bin" de epítipo diferente para determinar el nivel de señal positiva (de unión).

[0157] Se completaron una serie de experimentos para probar las propiedades de unión de 5 anticuerpos monoclonales anti-IL-21 purificados (de clones de hibridoma 362.78.1, 366.75.1.1, 366.328.10, 366.552.11.31, y 366.345.6.11) que se unen a IL-21 humana. El primer anticuerpo monoclonal anti-IL-21 de una pareja de ensayo se inmovilizó covalentemente usando una mezcla de 0,4 M EDC [N-etil-N'-(3-dietilamino-propil)carbodiimida] y 0,1 M NHS (N-hidroxisuccinimida) hasta una densidad de aproximadamente 1000 RU. Después de la inmovilización del anticuerpo, los sitios activos en la celda de flujo se bloquearon con etanolamina 1 M. El antígeno de IL-21 se diluyó hasta 100 nM y se dejó fluir sobre la superficie del anticuerpo inmovilizado. Posteriormente, el receptor soluble se diluyó a 10 μ g/ml y se dejó unir al antígeno de IL-21 capturado. Los experimentos de unión se realizaron con una velocidad de flujo de 30 μ l/min a 25°C. El tampón para estos estudios consistía en Hepes 10 mM, NaCl 0,3 M, tensoactivo P20 al 0,05%, CaCl₂ 5 mM, 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, pH 8,0. Entre los ciclos, la celda de flujo se lavó con ácido clorhídrico 20 mM para regenerar la superficie. Esta etapa de lavado elimina el antígeno de IL-21 y cualquier receptor soluble unido de la superficie de anticuerpo inmovilizado, y permitió la posterior unión de la siguiente muestra de ensayo. Los datos se compilaron utilizando BIACORE T100® (software de evaluación, versión 1.1.1).

[0158] Los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 purificados se caracterizaron por su capacidad para competir con el receptor soluble de IL-21 humana por la unión al antígeno de IL-21. La señal (RU, unidades de respuesta) indicados por el BIACORE está directamente correlacionada con la masa sobre la superficie del chip sensor. Una vez establecido el nivel de señal de fondo (RU) asociado con los controles negativos (el mismo anticuerpo monoclonal anti-IL-21 se utiliza tanto como anticuerpo primario como secundario), se indicaron los resultados de la competición como unión positiva o negativa. Unión positiva indica que el anticuerpo monoclonal anti-IL-21 y receptor soluble de IL-21 son capaces de unirse al antígeno al mismo tiempo. Unión negativa indica que el anticuerpo monoclonal anti-IL-21 y el receptor soluble de IL-21 no son capaces de unirse al antígeno al mismo tiempo. El diferencial entre los valores de respuesta positivos y negativos en este experimento fue significativa y permitió una determinación no ambigua de la competencia entre los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 y receptor soluble de IL-21.

[0159] Los anticuerpos monoclonales de clones de hibridoma 362.78.1 y 366.552.11.31 compitieron con las dos versiones del receptor soluble de IL-21 (IL-21R-Fc homodimérica y IL-21R γ -Fc heterodimérica) para la unión al antígeno de IL-21 humana. Los anticuerpos monoclonales de clones de hibridoma 366.328.10 y 366.345.6.11 no competían con ninguna versión del receptor soluble para la unión al antígeno. El anticuerpo monoclonal del clon de hibridoma 362.75.1.1 mostró competencia parcial para la unión con las dos formas del receptor soluble. Estos estudios se realizaron con el antígeno IL-21 pre-unido al anticuerpo monoclonal. Tres de estos anticuerpos (362.78.1, 366.328.10, 366.552.11.31) han demostrado neutralizar la IL-21, mientras que los anticuerpos monoclonales de anticuerpos de los clones de hibridoma 362.75.1.1 y 366.345.6.11, dependiendo del ensayo, eran

muy débiles o no neutralizadores de la bioactividad de IL-21.

Ejemplo 7 Ensayo de bioactividad de IL-21 Baf3/huIL-21R STAT3

5 **[0160]** El siguiente bioensayo STAT3 fosforilado se utilizó como cribado principal para medir la neutralización de
 títulos de anti-IL-21 en suero murino, así como los niveles relativos de neutralización de IL-21 por sobrenadantes de
 hibridoma y los anticuerpos anti-IL-21 purificados. La actividad de IL-21 se determinó midiendo el nivel de
 fosforilación de STAT3 después de la interacción ligando-receptor en las células Baf3/KZ134/huIL-21R (véase
 10 Spolski y Leonard, Annu Rev Immunol, 8 de noviembre 2007). Se determinó la actividad de neutralización basado en
 la disminución de los niveles de STAT3 fosforilado utilizando una concentración EC₅₀ de IL-21 y una titulación de
 antagonista.

15 **[0161]** Las células Baf3/KZ134/huIL-21R se lavaron dos veces con medio de ensayo (RPMI 1640 con suero bovino
 fetal al 5%, 1x Glutamax, 1% de piruvato sódico, y 2 µM beta-mercaptoetanol; todos de Invitrogen, Carlsbad, CA)
 antes de sembrarse a 40.000 células/pocillo en placas de cultivo de tejido de base redonda de 96 pocillos (Becton
 Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Las células se colocaron en una incubadora de cultivo de tejidos a 37°C mientras se
 prepararon las soluciones de ensayo. Para determinar las concentraciones EC₅₀ y EC₉₀ de IL-21 en este ensayo, se
 20 prepararon diluciones en serie de IL-21 humana recombinante en medio de ensayo y se sembraron en una placa
 separada de base U de 96 pocillos. Alternativamente, para la prueba de neutralización de IL-21, se preincubó una
 concentración EC₅₀ de IL-21 (se determinó que era 33 pM) con diluciones en serie de suero de ratón inmunizado con
 IL-21, medios de hibridoma agotados, anticuerpos IL-21R/γc-Fc humanos solubles purificados o anticuerpos
 monoclonales anti-IL-21 purificados. Tanto la placa de células como la placa de solución se incubaron a continuación
 en una cámara de cultivo de tejidos humidificada para equilibrarse durante 30 minutos a 37°C y 5% CO₂. Después
 25 de 30 minutos, la reacción se inició mediante la transferencia de las soluciones de IL-21 a la placa de células e
 incubando durante 10 minutos a 37°C y CO₂ al 5%.

30 **[0162]** Después de la incubación de 10 minutos, las reacciones se detuvieron mediante la colocación de la placa en
 hielo y añadiendo 125 µl de tampón de lavado celular enfriado en hielo (BIO-PLEX Cell Lysis Kit, Bio-Rad
 Laboratories, Hercules, CA) a cada pocillo. Las células fueron centrifugadas a 1500 rpm a 4°C durante 5 minutos y
 los medios se aspiraron. Para lisar las células, se añadió a cada pocillo 50 µl/pocillo de tampón de lisis (preparado
 de acuerdo con las instrucciones del fabricante, Bio-Rad Labs). Los lisados celulares se pipetearon arriba y abajo
 cinco veces, mientras estaban en hielo, y se agitaron en un agitador de plataforma de microplacas durante 20
 minutos a 600 rpm a 4°C. Las placas se centrifugaron a 3000 rpm a 4°C durante 20 minutos. Se recogieron los
 sobrenadantes y se transfirieron a una nueva placa de microtitulación y se mezclaron 1:1 con tampón de ensayo
 35 (BIO-RAD) para el almacenamiento a -20°C.

40 **[0163]** Las microesferas de captura (BIO-PLEX ensayo fosfo-STAT3, Bio-Rad Laboratories) se diluyeron y se
 sembraron en una placa de filtro de 96 pocillos (Millipore Corporation, Irlanda) según las instrucciones del fabricante.
 Las placas se lavaron dos veces con tampón de lavado (BIO-RAD) y se transfirieron a cada pocillo 50 µl de la
 mezcla de lisado celular. A continuación, cada placa se envolvió en papel de aluminio y se agitó durante la noche a
 temperatura ambiente y 300 rpm. El día siguiente, la placa se transfirió a un aparato de microtitulación de vacío y se
 lavó dos veces con tampón de lavado. Después de la adición de 25 µl/pocillo de anticuerpo de detección (BIO-RAD),
 la placa cubierta con papel aluminio se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación a 300 rpm.
 45 La placa se filtró y se lavó dos veces con tampón de lavado. Se añadió estreptavidina-PE (50 µl/pocillo; BIO-RAD) y
 la placa cubierta con papel aluminio se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación a 300 rpm.
 La placa se filtró y se lavó dos veces y se resuspendió en 125 µl/pocillo de tampón de resuspensión de microesferas
 (BIO-RAD). El nivel de STAT3 fosforilado se evaluó a continuación usando un lector de matrices (BIO-PLEX, Bio-
 Rad Laboratories) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos fueron analizados utilizando el software
 de análisis (BIO-PLEX Manager 3.0, Bio-Rad Laboratories). Los aumentos en el nivel del factor de transcripción
 50 STAT3 fosforilado presente en los lisados eran indicativos de una interacción receptor de IL-21-ligando. Para el
 ensayo de neutralización, las disminuciones en el nivel del factor de transcripción STAT3 fosforilado presente en los
 lisados eran indicativos de la neutralización de la interacción receptor de IL-21-ligando. Los valores de IC₅₀
 (concentración de antagonista que produce una inhibición del 50 por ciento de la actividad del ligando) se calcularon
 usando GraphPad Prism®4 (GraphPad Software, Inc., San Diego CA) y se expresaron como concentraciones
 55 molares para cada reactivo en el ensayo de neutralización.

60 **[0164]** IL-21 indujo la fosforilación de STAT3 de una manera dependiente de la dosis con una concentración EC₅₀
 que se determinó que era de aproximadamente 33 pM. La Tabla 7 resume los valores de IC₅₀ para el control positivo
 (proteína de fusión de IL-21R/γc-Fc humana soluble) y los elementos de neutralización de IL-21 descritos en este
 documento. Estos datos indican que los elementos neutralizantes de IL-21 se mantuvieron activos y eran igual o
 mejor que el control positivo en la reducción de la fosforilación de STAT3 inducida por IL-21.

Tabla 7: Valores IC₅₀ en ensayo de fosforilación de STAT-3

	IC ₅₀ (pM) Exp # 1	IC ₅₀ (pM) Exp # 2	IC ₅₀ (pM) Exp # 3
--	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------

hIL-21R/ γ c-Fc	25	102	140,2
Clon de mAb de IL-21 #			
362.75.1	No neut.		
362.78.1	14	60	
362.78.1.44		41	66,7
362.78-CHO (A2162F)			42,0
366.2328.10.63	210		
366.552.11.31	59		
366.617.7	69		
366.345.6.11	Débil		

* Experimento 3 se realizó utilizando 96 pM de IL-21

Ejemplo 8 Ensayo de bioactividad de STAT-luciferasa en IL-21 Baf3/huIL-21R

[0165] Este ensayo de 24 horas mide la actividad de STAT-luciferasa inducida por IL-21 en células transfectadas Baf3/KZ134/huIL-21R. Las células transfectadas Baf3/KZ134/huIL-21R se lavaron dos veces con medio de ensayo (RPMI 1640 sin rojo de fenol con suero bovino fetal 5%, 1x Glutamax, 1% de piruvato sódico, y 2 μ M beta-mercaptoetanol; todos de Invitrogen, Carlsbad, CA) antes de sembrarse a 40.000 células/pocillo en placas de cultivo blancas opacas de base plana de 96 pocillos (Corning/Costar, Lowell, MA). Las células se colocaron después en una incubadora de cultivo de tejidos, mientras que se prepararon las soluciones de ensayo. En una placa separada, la IL-21 se mezcló con cualquiera de medio o una gama de antagonistas de IL-21 (anticuerpos monoclonales o receptor IL-21/ γ c-Fc soluble humana). Una vez mezclados, esta placa también se transfirió a una incubadora de cultivo de tejidos humidificada a 37°C. Después de 30 minutos, las soluciones de ensayo se transfirieron a la placa de células y se mezclaron. A continuación, esta placa se colocó de nuevo en la incubadora durante 24 horas. Después de 24 horas, las células se retiraron de la incubadora y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Cada pocillo se diluyó 1:1 con un volumen de 100 μ l de reactivo de luciferasa Steady Glo (Promega, Madison, WI) y se mezcló a fondo. La placa se cubrió y se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y las unidades relativas de luciferasa (RLU) se midieron en un luminómetro.

[0166] Para determinar las concentraciones de EC₅₀ y EC₉₀ de IL-21 en este ensayo, se ensayaron diluciones en serie de IL-21 humana recombinante que van de 0 a 100 ng/ml. La concentración EC₉₀ de IL-21, ~ 15 ng/ml (961 pM), se utilizó en experimentos de neutralización posteriores. En estos experimentos, los clones 362.78.1 (y su subclón 362.78.1.44 y homólogo expresado en CHO, 362.78-CHO; véase el Ejemplo 1) y 362.328.10.63 demostraron la actividad anti-IL-21 más potente, con concentraciones IC₅₀ en el rango de 300-850 pM, mientras que los valores de IC₅₀ para el control receptor IL-21/ γ c-Fc humano soluble osciló entre 650-1830 pM. Las actividades relativas de los elementos de neutralización descritos en el presente documento se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8: Valores IC₅₀ en ensayo de STAT-luciferasa de 24 horas

	IC ₅₀ (pM) Exp # 1	IC ₅₀ (pM) Exp # 2	IC ₅₀ (pM) Exp # 3
hIL-21R/ γ c-Fc	650-850	1830	
Clon de mAb de IL-21 #			
362.75.1	No neut.		
362.78.1	400	775	760
362.78.1.44		850	
362.78-CHO (A2162F)			533
366.328.10.63	300-500		
366.552.11.31	2400		
366.617.7	6360		
366.345.6.11	3184		

Ejemplo 9 Reacción cruzada a la actividad de IL-21 de mono Cynomolgus, murino o de rata

[0167] Los estudios de reacción cruzada (especialmente para la reactividad cruzada de primates no humanos) son importantes de completar antes de los estudios de farmacología de preclínica/toxicológicos en el desarrollo de un antagonista terapéutico. Con el fin de determinar si los elementos neutralizantes de anti-IL-21 humana descritos en este documento pueden reaccionar de manera cruzada y neutralizar la actividad inducida por IL-21 de cynomolgus, IL-21 murino o IL-21 de rata (y por lo tanto, justificar los monos cynomolgus, ratones y/o ratas como especies de prueba viables), primero fue necesario demostrar la bioactividad de IL-21 recombinante de cynomolgus, murina y de rata. Se utilizaron métodos para ensayos de actividad de STAT-luciferasa de IL-21 descritos en el Ejemplo 8 para determinar los valores de EC₅₀ y EC₉₀ para IL-21 recombinante humana, de cynomolgus, murina y de rata (todos producidos en ZymoGenetics). Los resultados indican que los niveles de actividad de STAT-luciferasa inducida por

IL-21 humano, cynomolgus y murino en este ensayo difieren ampliamente. Los valores de EC₉₀ utilizados en los experimentos posteriores se determinó que eran los siguientes: 961 pM para la IL-21 humana; 102 pM para IL-21 de mono cynomolgus; 6,41 nM para la IL-21 de ratón y 1,08 nM para la IL-21 de rata. El receptor soluble de IL-21 (hIL-21R/γc-Fc) neutralizaba los efectos de cynomolgus, murina y de rata.

[0168] IL-21. La adición de los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 purificados mostrados en la Tabla 9 neutralizaba La IL-21 de cynomolgus en diversos grados, pero no neutralizó la IL-21 murina o de rata (cabe indicar que sólo 362.78-CHO y 366.552.11 se ensayaron frente a IL-21 de rata). Los valores de IC₅₀ para la neutralización de IL-21 de cynomolgus por los elementos de neutralización descritos en este documento oscilaron entre -100 pM y 431 pM y se resumen en la Tabla 9. Cabe señalar que los mejores anticuerpos neutralizantes de IL-21 humana eran todos capaces de neutralizar eficazmente IL-21 de cynomolgus, pero no IL-21 murina o IL-21 de rata. Además, el mAb de IL-21 producida por células CHO (362.78-CHO) se ensayó en un experimento separado usando una concentración de 800 pM de IL-21 de mono cynomolgus.

Tabla 9: Reacción cruzada de antagonistas de hIL-21 a IL-21 de mono cynomolgus, murino y rata en el ensayo de STAT-luciferasa

	IL-21 de cyno IC ₅₀ ([cIL-21] = 100 pM)		IL-21 murina IC ₅₀ ([mIL-21] = 6,41 nM)		IL-21 de rata IC ₅₀ ([rIL-21] = 1,08 nM)	
	ng/ml	Concentración molar	ng/ml	Concentración molar	ng/ml	Concentración molar
hIL-21R/γc-Fc soluble	20	385 pM	425,8	8,06 nM	707,5	13,4 nM
<i>Clon de mAb de IL-21:</i>	débil	--				
362.75.1	60	--	ninguno	ninguno	N/T	N/T
362.78.1	255	400 pM	ninguno	ninguno	N/T	N/T
362.78-CHO (A2162F)*	15	1,7 nM	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
366.328.10	23	100 pM	ninguno	ninguno	N/T	N/T
366.552.11	65	156 pM	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
366.617.7		431 pM	ninguno	ninguno	N/T	N/T

*- Nota: Clon 362.78-CHO (ejemplo 1b) se ensayó utilizando una concentración 800 pM de cIL-21 en lugar de 100 pM tal como se usó en otros experimentos. N/T = no probado.

Ejemplo 10 Evaluación de la potencial reacción cruzada con IL-4 en un ensayo basado en células

[0169] En el desarrollo de un antagonista de citoquina terapéutica, es importante saber si reaccionará de forma cruzada con y neutralizará citoquinas relacionadas estructuralmente. Este ensayo de proliferación de células B primarias fue diseñado para probar los elementos neutralizantes de IL-21 descritos en este documento para la reacción cruzada a y neutralización de IL-4 humana.

[0170] Aislamiento de las células B primarias: Para obtener células B primarias, se recogieron 200 ml de sangre periférica de voluntarios humanos sanos (ZymoGenetics). La sangre se diluyó hasta 400 ml con PBS a temperatura ambiente y se tomaron alícuotas de 35 ml en tubos cónicos de 50 ml. Se colocaron en una subcapa catorce ml de Ficoll/Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Suecia) a temperatura ambiente y los tubos se centrifugaron durante 20 minutos a 2000 rpm. La capa de interfase de PBMC se aspiró y se lavó dos veces con tampón de MACS (PBS, HEPES 20 mM, y 1% de BSA; Invitrogen, Carlsbad, CA). Se contaron las células y las células B se seleccionaron negativamente utilizando el kit de aislamiento de células B de Miltenyi Biotec (Auburn, CA) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Una pequeña muestra de las células B purificadas se ensayó para determinar la pureza mediante análisis de FACS y se encontró que > 97% de células B CD19⁺ eran puras en todos los experimentos.

[0171] Ensayo de proliferación: las células B proliferan en respuesta a un cocultivo de IL-4 con anti-IgM inmovilizado. Para determinar la potencial reacción cruzada a y neutralización de IL-4 por los mAb anti-IL-21, las células B aisladas previamente se sembraron primero a 40.000-50.000 células/pocillo en una placa de cultivo tisular de base U de 96 pocillos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) que se había precubierto con 1,0 μg/ml de anti-IgM (Southern Biotech, Birmingham, AL). Las células se trataron a continuación con 10 ng/ml de IL-4 recombinante humano (R & D Systems; Minneapolis, MN) y una serie de titulación de un antagonista de IL-21 (anticuerpos de prueba o controles). Las células se incubaron a continuación durante 3 días a 37°C y 5% de CO₂ en un incubador de cultivo de tejidos humidificado. Después de tres días, las células se pulsaron con 1 μCi/pocillo de [³H]-timidina (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Después de 16 horas, las células se recogieron sobre filtros de fibra de vidrio y se cuantificó la cantidad de incorporación de ³H usando un contador beta (Topcount NXT, Packard). Ninguno de los tres anticuerpos monoclonales anti-IL-21 ensayados (362.78.1, 366.328.10.6 y 366.552.11.31) mostró alguna neutralización de la proliferación inducida por IL-4 hasta un exceso molar de 250 veces.

Ejemplo 1111A. Evaluación de la potencial reacción cruzada con IL-2 e IL-15 en un ensayo basado en células

[0172] En el desarrollo de un antagonista de citoquina terapéutica, es importante determinar si reaccionará de forma cruzada con y neutralizará las citoquinas relacionadas estructuralmente. Se puede inducir la línea de células T murina, CTLL-2, para proliferar en respuesta a IL-2 o IL-15 humana. Por lo tanto, este ensayo fue elegido para probar los elementos neutralizantes de IL-21 descritos en este documento para la reacción cruzada a y neutralización de IL-2 y IL-15 humanas.

[0173] Las células CTLL-2 se lavaron tres veces en medios de bioensayo de proliferación (RPMI 1640, 2x Glutamax, 10% de FBS, 2x NaPyr, 1x β-mercaptoetanol y HEPES 20 mM; Invitrogen, Carlsbad, CA), y se sembraron a 50.000 células por pocillo en placas de cultivo de tejido de base redonda de 96 pocillos (Becton Dickinson, Franklin Falls, NJ). A estas células, se añadió una dosis predeterminada EC₉₀ de cualquiera de IL-2 (3,0 ng/ml) o IL-15 (0,5 ng/ml) en combinación con una dilución en serie de los elementos neutralizantes de IL-21. La relación de citoquinas a anticuerpos varió de un exceso molar de 250 veces a una relación 1:1. Los anticuerpos neutralizantes anti-IL-2 o anti-IL-15 (ambos de R & D Systems, Minneapolis, MN) se usaron como controles positivos. Las células se incubaron entonces durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ en un incubador de cultivo de tejidos humidificado. Después de 24 horas, las células se pulsaron con 1 μCi/pocillo de [³H]-timidina (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Después de 16 horas, las células se recogieron sobre filtros de fibra de vidrio y se cuantificó la cantidad de incorporación de ³H usando un contador beta (Topcount NXT, Packard).

[0174] Resultados: Ninguno de los tres anticuerpos monoclonales anti-IL-21 ensayados (362.78.1, 366.328.10.6 y 366.552.11.31) mostró alguna neutralización de la proliferación inducida por IL-2 o IL-15.

1B. Confirmación usando resonancia de plasmón superficial (Biacore) que el mAb de IL-21 362.78-CHO no se une a citoquinas humanas relacionados con IL-21: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 o IL-15.

[0175] El mAb anti-IL-21 362.78-CHO se evaluó mediante resonancia de plasmón de superficie para la potencial de reactividad cruzada con IL-2 humana, IL-4 humana, IL-7 humana, IL-9 humana e IL-15 humana.

[0176] Materiales y Métodos: Los experimentos se completaron para probar la reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 362.78-CHO para IL-2 humana, IL-4 humana, IL-7 humana, IL-9 humana, e IL-15 humana. Se llevaron a cabo estudios de unión en un BIACORE T100® (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Los métodos fueron programadas utilizando BIACORE T100® (Software de Control, v 2.0) El anticuerpo específico de IgG Fc-gamma anti-humana de cabra (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) se inmovilizó covalentemente a las celdas de flujo 1 y 2 de un chip sensor CM4 utilizando química de acoplamiento de amina (EDC:NHS). El anticuerpo monoclonal anti-IL-21 purificado 362.78-CHO se capturó posteriormente en la celda de flujo 2 del chip sensor a una densidad de aproximadamente 240 células RU. La celda de flujo 1 se utilizó como la superficie de referencia.

[0177] Se inyectaron IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15 (todos comprados de R & D Systems, Minneapolis, MN) sobre la superficie de anticuerpo capturado (celda de flujo 2) y la celda de flujo de referencia (celda de flujo 1) a concentraciones de 100, 20 y 4 nM. Como control positivo para este conjunto de experimentos, IL-21 (producido en ZymoGenetics) también se inyectó a concentraciones idénticas. Se realizaron estudios de unión con un flujo de 25 μl/min, un tiempo de asociación de 2 minutos, y un tiempo de disociación de 3 minutos. Todos los experimentos de unión se realizaron a 25°C en un tampón de HEPES 10 mM, NaCl 300 mM, 5 mM CaCl₂, tensoactivo P20 al 0,05% (Biacore), 1 mg/ml de albúmina de suero bovino, pH 8,0. Entre los ciclos, la celda de flujo se lavó con ácido clorhídrico 20 mM para regenerar la superficie. Esta etapa de lavado eliminaba tanto el anticuerpo 362.78-CHO capturado como cualquier antígeno unido a la superficie del chip. Los datos se compilaron utilizando BIACORE T100® (software de evaluación, versión 2.0). Los datos se procesaron restando la celda de flujo de referencia y las inyecciones de blanco. La estabilidad de línea de base se evaluó para asegurar que la etapa de regeneración proporciona una superficie de unión constante a través de la secuencia de inyecciones.

[0178] Resultados: No se observó unión de IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, o IL-15 al anticuerpo 362.78-CHO. En cambio, el control positivo de IL-21 mostró una unión dependiente de la dosis que era coherente con los estudios anteriores.

[0179] Esta falta de reactividad cruzada se explicó posteriormente por estudios de mapeo de epítipo del clon 362.78 (véase el Ejemplo 17). Los aminoácidos situados en y cerca de la hélice D de IL-21 que observó que estaban unidos por el clon 362.78 (EKKPPKEFLERFKSLL; SEQ ID NO: 2 desde el residuo 129 al 144) no están bien conservados entre las citoquinas relacionadas de cadena gamma humanas, ni en la IL-21 de ratón, tal como se muestra a continuación en la tabla 10.

Tabla 10

IL21_HUMANA ----- TCPSCDSYEKK - PPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSTHGSEDS
 IL21_RATÓN ----- KCPSCDSYEKR - TPKEFLERLKWLLQKMIHQHLS
 IL15_HUMANA ----- CKECEEELEEK - NIKEFLQSFVHIVQMFINTS
 IL2_HUMANA ----- TTFMCEYADET-ATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
 5 IL4_HUMANA --- GLAGLNSCPVKKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSKCSS
 IL7_HUMANA --- SLEENKSLKEQKK-LNDLCFLKRLLQEIKTCWNKILMGTKHEH
 IL9_HUMANA ----- CEQPCNQTTAG - NALTFLKSLLEIFQKEKMRGMRGKI

10 [0180] La IL-21 humana se muestra como SEQ ID NO: 2; la IL-21 de ratón se muestra como SEQ ID NO: 11; la IL-15 humana se muestra como SEQ ID NO: 92; la IL-2 humana se muestra como SEQ ID NO: 93; la IL-4 humana se muestra como SEQ ID NO: 94; la IL-7 humana se muestra como SEQ ID NO: 95; la IL-9 humana se muestra como SEQ ID NO: 96.

15 Ejemplo 12-Ensayos de proliferación de células B

Ensayos de células B primarias

20 [0181] A fin de probar la actividad de los elementos neutralizantes de IL-21, se desarrollaron dos ensayos de células B primarias. El ensayo de proliferación de células B se utilizó para demostrar la neutralización de la proliferación inducida por IL-21 durante 4 días y el ensayo diferenciación de células B demostró la neutralización de la diferenciación de células de plasma inducida por IL-21 durante 8 días. Estos experimentos demostraron la neutralización de IL-21 en ensayos a largo plazo biológicamente relevantes.

25 [0182] Aislamiento de las células B humanas primarias: Para obtener células B primarias, se recogieron 200 ml de sangre periférica de voluntarios humanos sanos (ZymoGenetics). La sangre se diluyó hasta 200 ml con PBS a temperatura ambiente y se tomaron alícuotas de 35 ml en tubos cónicos de 50 ml. Se colocaron en una subcapa catorce ml de Ficoll/Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Suecia) a temperatura ambiente y los tubos se centrifugaron durante 20 minutos a 2000 rpm. La capa de interfase de PBMC se aspiró y se lavó dos veces con tampón de MACS (PBS, HEPES 20 mM, y 1% de BSA; Invitrogen, Carlsbad, CA). Se contaron las células y las células B se seleccionaron negativamente utilizando el kit de aislamiento de células B de Miltenyi Biotec (Auburn, CA) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Una pequeña muestra de las células B purificadas se ensayó para determinar la pureza mediante análisis de FACS y se encontró que > 97% eran puras en todos los experimentos.

35 [0183] Ensayo de proliferación: las células B proliferan en respuesta a un cocultivo con anti-CD40 y IL-21. Para determinar actividad de neutralización de los anticuerpos monoclonales anti-IL-21, las células B se sembraron a 40.000-50.000 células/pocillo en una placa de cultivo tisular de base U de 96 pocillos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Las células se trataron a continuación con 0,1 µg/ml de anti-CD40 (anti-CD40 humano policlona de cabra; R & D Systems, Minneapolis, MN), 50 ng/mL (3,21 nM) de IL-21 recombinante IL-21 (ZymoGenetics, A1207F) y una titulación de un antagonista de IL-21 (mAbs de prueba o controles). Las placas de células se incubaron a continuación durante 3 días a 37°C y 5% de CO₂ en un incubador humidificado. Después de tres días, las células se pulsaron con 1 µCi/pocillo de [³H]-timidina (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Después de 16 horas, las células se recogieron sobre filtros de fibra de vidrio y se cuantificó la cantidad de incorporación de ³H usando un contador beta (Topcount NXT, Packard). Las curvas de IC₅₀ que miden la neutralización efectiva de la proliferación inducida por IL-21 se calcularon y se expresaron como una concentración molar. Los valores de IC₅₀ para los mejores mAB neutralizantes descritos en este documento oscilaron entre 0,71 nM y 6,55 nM y se resumen en la Tabla 11:

Tabla 11: Neutralización de IL-21 en un ensayo de proliferación de células B

Antagonista de IL-21	IC50 (nM)
hIL-21R/γc-Fc	3,5
362.75.1	Sin neutralización
362.78.1	1,17
366.328.10	0,71
366.552.11	4,75
366.617.7	6,55

50 [0184] Ensayo de diferenciación de células B: la diferenciación de células B sin tratar en células plasmáticas productoras de anticuerpos se ve facilitada en gran medida in vitro cuando IL-21 se combina con anti-CD40 e IL-4 (Ettinger et al, *J Immunol* 175: 7867-79, 2005; Ettinger et al, *J Immunol* 178: 2872-82, 2007; Kuchen et al *J Immunol* 179: 5886-96, 2007). Para demostrar la actividad en un ensayo de más largo plazo que los dos ensayos de cribado basados en Baf3 descritos en los Ejemplos 7 y 8, los elementos de neutralización descritos en este documento se utilizaron para neutralizar IL-21 e inhibir la diferenciación de células de plasma humano. Para lograr esto, se sembraron células B humanas primarias a 150.000 células/pocillo en una placa tratada de cultivo de tejidos de base plana de 96 pocillos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Las células se trataron a continuación con 0,1 µg/ml

anti-CD40 (anti-CD40 humano policlonal de cabra; R & D Systems, Minneapolis, MN), 10 ng/ml de IL-4 recombinante humana (R & D Systems) y 25 ng/mL (1,6 nM) de IL-21 humana recombinante (ZymoGenetics). A continuación se añadieron antagonistas de IL-21 (mAbs de prueba o controles) y las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante ocho días en un incubador humidificado. Al final de ocho días, se recogieron medios acondicionados (por

[0185] Análisis de células B usando citometría de flujo: Las células se resuspendieron en tampón FACS humano (HBSS, HEPES 20 mM, 1% de BSA (todos de Invitrogen) y 2% suero de Ab humano (Gemini Bio-Products, Woodland, CA)) durante cinco minutos para bloquear los receptores de Fc. Las células se centrifugaron después (5 minutos a 1200 rpm) y se aspiraron. Las manchas se prepararon diluyendo anticuerpos 1:100 en tampón FACS humano y dispensaron 100 µl por muestra. Las manchas individuales (para ajustar los parámetros de compensación del citómetro) y una mezcla multi-mancha se prepararon utilizando los siguientes anticuerpos: anti-CD138-FITC, anti-IgD-PE, anti-CD38-PE-Cy5.5 y anti-CD19-APC. Las células plasmáticas se definieron como células grandes (evaluado mediante dispersión de la luz hacia adelante) CD19⁺, IgD^{lo}, CD38⁺ y CD138⁺. Se utilizó el porcentaje de células plasmáticas en relación con el total de células B para determinar la eficacia de los elementos de neutralización descritos en este documento.

[0186] Resultados: Cuando IL-21 se combinó con IL-4 y anti-CD40, aproximadamente el 50% de las células B grandes vivas en el día 8 eran células plasmáticas IgD^{low}, CD138⁺. Sin IL-21, la proporción de células plasmáticas fue de ~ 8% de las células B grandes. La adición de los diversos antagonistas de IL-21 a los cultivos que contienen IL-21 disminuyó la proporción de células de plasma en una forma dependiente de la dosis. El clon 362.78.1 era el neutralizador más eficaz, y neutralizó casi completamente la actividad de IL-21 en las relaciones de antagonista:ligando de 10:1 y 2,5:1. Los otros anticuerpos ensayados, clones 366.328.10.63 y 366.552.11.31, eran casi tan eficaces para neutralizar la diferenciación impulsada por IL-21. Estos datos se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12: Inhibición de la diferenciación de células del plasma mediante la neutralización mAb anti-IL-21

	Relación antagonista:ligando			
	10:1	2,5:1	0,6:1	0,16:1
Antagonista de IL-21	% células plasmáticas IgD-low, CD138+			
362.78.1	13,7	15,5	34,1	42,8
366.328.10.63	15,4	20,2	41,4	52,1
366.552.11.31*	15,4	26,4	44,8	50,3
Receptor de IL-21	23,4	41,7	54,2	66,7

* cabe indicar que las relaciones antagonista:ligando reales para el clon 366.552.11.31 fueron 14,4, 3,6, 0,9 y 0,22:1

Ejemplo 13-Modelo de ratón de DTH

[0187] Las respuestas de DTH son respuestas inmunes clásicas que son iniciadas por las células T CD4 + y mediadas por células T, neutrófilos y macrófagos. Una respuesta de DTH es un buen indicador de una respuesta mediada por células T CD4 +. Los ratones son inmunizados por vía subcutánea con la proteína ovoalbúmina de pollo (OVA) en cualquiera de 2 adyuvantes, adyuvante completo de Freund (CFA; Sigma) o Ribí (Sigma; también conocido como adyuvante MPL + TDM + CWS). Esta fase se llama la fase de sensibilización (día 0-6). Las mediciones de la oreja se toman siete días más tarde. Los ratones son inyectados en la oreja con el control PBS (oreja izquierda) u OVA (oreja derecha). Esta fase se llama la fase de exposición (días 7-8). Las respuestas inmunes generadas a OVA inducen la inflamación en la oreja dando lugar a un aumento de grosor de la oreja en 24 horas en el tratado con OVA, pero no en la oreja tratado con PBS. Esto se mide usando calibres.

[0188] Se inmunizan ratones C57BL/6 (n = 8/grupo) en la espalda con 100 µg de ovoalbúmina de pollo (OVA) emulsionada en CFA en un volumen total de 200 µl. Si se utiliza Ribí en lugar de CFA, se añade 0,5 mg/ml de ovoalbúmina a un solo vial de RIBI y se agita vigorosamente durante 2 minutos para formar una emulsión que se utiliza para inyectar ratones. Siete días después de la inmunización, los ratones se inyectaron con 10 ul de PBS en la oreja izquierda (control) y con 10 ug de OVA en PBS en la oreja derecha en un volumen de 10 ul. Se mide el grosor de las orejas de todos los ratones antes de la inyección de los ratones en el oído (medición 0). El grosor de la oreja se midió 24 horas después de la estimulación. Se calcula la diferencia en el grosor de la oreja entre la medición 0 y la medición de 24 horas y es un reflejo de la inflamación en el oído. Se inyectan grupos de ratones con PBS o diferente concentración de anticuerpo anti-IL-21 por vía intraperitoneal los días 0-6 (fase de sensibilización) o días 7-8 (fase de estimulación). La inyección en el día 7 y 8 se proporciona 2 horas antes de medir el grosor de la oreja a los puntos de tiempo de 0 y 24 horas. Al final del período de 24 horas, una vez que se midió grosor de la oreja, se cortaron las orejas y se colocaron en formalina para el análisis histológico.

Ejemplo 14 Modelo de ratón para la esclerosis múltiple

[0189] Para probar si anti-IL-21 tiene efectos en la esclerosis múltiple, se prueba la capacidad de los anticuerpos anti-IL-21 de inhibir la encefalomielititis autoinmune experimental (EAE-MS), un modelo de ratón para MS. Se utiliza el

modelo de inmunización de péptido 35-55 de glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) dependiente de células T en ratones C57BL/6. El experimento se ejecuta para determinar que el anticuerpo anti-IL-21 podía retrasar y/o inhibir puntuaciones de enfermedad en EAE, ya sea mediante la inhibición de la presentación de antígenos mediada por DC o mediante el aumento de las respuestas de células T CD8. La ausencia de respuestas eficientes de células T CD8 en este modelo exacerba la EAE (Malipiero y otros, Eur J. Immunol., 27: 3151-3160, 1997). El retraso en la aparición de la enfermedad en el modelo de EAE de una manera dependiente de la dosis sugiere que el uso de anticuerpo anti-IL-21 puede ser beneficioso en la EM.

[0190] La EAE es un modelo de ratón para la EM. En uno de estos modelos, los ratones C57BL/6 se inmunizan con 100 µg de péptido MOG (MOG35-55) o 100 µg de proteína MOG recombinante emulsionada en adyuvante CFA. Se añaden dos mililitros de una preparación 0,5 mg/ml de MOG35-55 en PBS a un vial de CFA y se agita vigorosamente para emulsionar la solución o se prepara una relación 1:1 de MOG recombinante en CFA. Las espaldas de los ratones se afeitan y se inyectan 100 µg de MOG/CFA en la espalda de ratones. Los pesos de los ratones se toman 2 días antes y todos los días después de la inmunización. Los ratones se inyectan entonces el día 2 i.v. con 200 µl de toxina pertussis (PT), una concentración final de 200 ng/ratón. Los ratones son controlados diariamente por las puntuaciones clínicas. Se inyectan grupos de ratones i.p. con 200 µl PBS, 100 µg de BSA, 10 µg -200 µg de anticuerpo anti-IL-21 en un volumen de 200 µl de los días 0-20, o 3 veces a la semana durante 3 semanas. Los pesos de los ratones, las puntuaciones clínicas y la incidencia se evalúan y se representan para el análisis.

Ejemplo 15: Anticuerpo anti-mIL-21 disminuye incidencia y la progresión de la enfermedad en un modelo de ratón de colitis y psoriasis por transferencia adoptiva de células T

[0191] La transferencia adoptiva de células T sin tratar en ratones desparejados de histocompatibilidad menor o inmunocomprometidos singénicos conduce al desarrollo de colitis (Leach MW et al 1996, Powrie F et al, 1997), así como lesiones en la piel que se asemejan psoriasis (Schon MP et al., Nat Med. 2: 183-8, 1997; Davenport CM et al, Int Immunopharmacol 5: 653-72, 2002). El trasplante de tan sólo 0,2 millones de células T CD4+ CD25- de ratones BALB/C o B10.D2 en ratones SCID C.B-17 inmunocomprometidos da lugar a la pérdida de peso, heces positivo en Hemocult y el desarrollo de lesiones de la piel. Los síntomas en estos ratones varían de una colonia a otra.

[0192] Este modelo de colitis/psoriasis tiene algunas similitudes con la enfermedad de Crohn y la psoriasis humana, y ha sido ampliamente utilizado para probar la eficacia de agentes terapéuticos para estas enfermedades en los seres humanos. Para este experimento, se obtuvieron ratones (8 donantes ratones hembra B10.D2; 50 receptores femeninos SCID CB-17) de Jackson Laboratories o Charles River Laboratories, respectivamente. Se recogieron bazo de 8 ratones B10.D2. Se aislaron las células T CD4+ CD25 de bazo agrupados utilizando metodología estándar conocida en la técnica. La pureza de la población de células T se evaluó por citometría de flujo.

[0193] Los ratones SCID CB-17 sin tratar recibieron 5×10^5 células T CD4+ CD25 (aisladas de bazo de ratones B10.D2) a través de inyección intravenosa en el día 0. Todos los ratones se pesaron al menos cinco veces por semana y se observó cuidadosamente la pérdida de peso, que puede estar asociado con colitis. Además, se tomó una puntuación de colitis clínica [consistencia de las heces y sangre en las heces] por lo menos un día por semana. Los ratones también fueron monitorizados cuidadosamente por lo menos cinco días por semana y se les asignó una puntuación para ñps signos de síntomas de psoriasis (pérdida de cabello, rascarse, alopecia, etc.).

[0194] Se administró un anticuerpo de rata anti-IL-21 de ratón (mIL-21), un anticuerpo de control de isotipo de rata, o vehículo (PBS) a grupos de ratones empezando en el día 0. Los tratamientos fueron administrados como inyecciones intraperitoneales, dos veces a la semana, administrando los anticuerpos a 0,2 ó 0,8 mg por ratón por dosis. También podrían administrarse usando un régimen de dosificación similar u otra vía de administración. Hubo 9 - 10 ratones por grupo en los grupos de anticuerpos anti-IL21, 6-7 ratones por grupo en los grupos de anticuerpo de control de isotipo, y 10 ratones por grupo en el grupo de PBS. Este régimen de dosificación se refiere como "dosificación profiláctica".

[0195] En un experimento separado, grupos de ratones dosificados con los mismos anticuerpos y las dosis descritas anteriormente (10 ratones por grupo) comenzaron sus tratamientos en el día 12 después de la transferencia celular, que es aproximadamente el día que los ratones comenzaron a mostrar signos de psoriasis y/o colitis. Este régimen de dosificación se refiere como "dosis terapéutica".

[0196] Al final del estudio (día 45), se sometió tejido colónico para evidencia histológica de colitis y suero para el análisis de los niveles de citoquinas y quimioquinas.

[0197] Resultados de la dosificación profiláctica: Los ratones que recibieron el anticuerpo anti-mIL-21, tanto a una dosis de 0,2 como de 0,8 mg fueron caracterizados por la reducción significativa (al menos $p < 0,05$ o mejor) e pérdida de peso corporal y reducciones significativas en la piel psoriásica y síntomas de colitis durante todo el período experimental en comparación con ratones administrados con PBS o 0,2 mg de anticuerpo monoclonal de control de isotipo. Al final del estudio (día 45), los ratones tratados con cualquiera de las dosis del anticuerpo mIL-21 estaban aproximadamente al 100% de su peso corporal inicial, mientras que los ratones tratados con PBS habían

perdido una media de 16% de su peso corporal y los ratones tratados con un anticuerpo de control de isotipo habían perdido el 10 - 15% del peso corporal inicial. En el día 45, los ratones tratados con cualquiera de las dosis del anticuerpo mIL-21 tenían aproximadamente 6,5 - 7 veces menor de puntuaciones clínicas de colitis en promedio y aproximadamente de 5 - 7 veces menor de puntuación promedio de la piel psoriásica. Sólo 20% de los ratones tratados con 0,2 mg de anticuerpo anti-mIL-21 desarrollaron psoriasis, que fue leve, mientras que ninguno de los ratones tratados con la dosis de 0,8 mg desarrolló ningún síntoma de piel psoriásica. Por otra parte, 100% de los ratones tratados con PBS desarrolló psoriasis, con aproximadamente el 50% de estos ratones desarrollando síntomas graves. Al final del estudio, también hubo una reducción significativa en los índices histológicos de colitis (puntuación de la inflamación intestinal, lesiones, y la arquitectura) en los ratones tratados con anticuerpos anti-mIL-21 en comparación con ratones tratados con PBS y 0,2 mg de isotipo de control.

[0198] Los ratones tratados con anticuerpo anti-mIL-21 tenían niveles en suero significativamente más bajos de IL-6, RANTES, TNF-alfa, y de MIP-1 β en comparación con los ratones tratados con PBS, apoyando adicionalmente el papel antiinflamatorio para el anticuerpo anti-21-mIL.

[0199] Resultados de dosificación terapéutica: Los ratones que recibieron el anticuerpo anti-mIL-21 a las dosis de 0,2 y 0,8 mg, empezando el día 12 después de las transferencias de células T, se caracterizaron por la reducción de pérdida de peso corporal y una reducción significativa en los síntomas de colitis en todo el período experimental en comparación con ratones administrados con el anticuerpo monoclonal de control de isotipo. Al día 45, los ratones tratados con cualquiera de las dosis del anticuerpo anti-mIL-21 tenían aproximadamente 3,5-4 veces puntuaciones clínicas de colitis inferiores en promedio en comparación con ratones tratados con anticuerpo de control de isotipo. Los ratones tratados con la dosis de 0,8 mg de anticuerpo anti-mIL-21 tenían puntuaciones más bajas de psoriasis que el anticuerpo de control de isotipo o ratones tratados con PBS.

[0200] Resumen: En conjunto, estos resultados indican que la administración in vivo de un anticuerpo anti-mIL-21 fue eficaz en la reducción de la colitis y la aparición de la psoriasis y la gravedad en un modelo de transferencia de células T murino, y sugieren que los anticuerpo anti-IL-21 pueden ser eficaces en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal humana y/o psoriasis.

Ejemplo 16 Modelo de ratón de hipersensibilidad de contacto

[0201] La hipersensibilidad de contacto puede ser inducida en ratones usando una variedad de alérgenos de contacto incluyendo dinitrofluorobenceno (DNFB) y oxazolona. Los ratones se sensibilizaron por vía tópica con el alérgeno en un vehículo de acetona y aceite de oliva y a continuación se estimuló 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 (día 0-5) o durante la fase de estimulación (días 5-6). La inhibición de grosor de la oreja antagonizando IL-21 indica un papel para IL-21 en la inducción de la hipersensibilidad de contacto.

[0202] Se pintan ratones C57B1/6 en la parte posterior con DNFB al 0,5% en acetona:aceite de oliva (4:1) o acetona:aceite de oliva solo en el día 0. En el día 5, se mide el grosor de la oreja de los ratones usando calibradores y se estimulan los ratones en las orejas con aceite de oliva solo (control) o DNFB al 0,25% en aceite de oliva mediante goteo de una solución de 25 μ l en la oreja. El cambio en el grosor de la oreja se midió en el día 6 y la inflamación se calcula como la diferencia en grosor de la oreja entre el día 5 y el día 6. Los grupos de ratones son inyectados i.p. con PBS o 10-100 μ g de anticuerpos anti-IL-21 en cualquiera de los días 0-5 o 5-6.

[0203] La inhibición del grosor de la oreja por anticuerpos anti-IL21 demuestra que los anticuerpos anti-IL-21 pueden ser útiles en la inhibición de la hipersensibilidad de contacto.

Ejemplo 17 Mapeo de epítomos

A. Experimento de intercambio del hidrógeno-deuterio (HDx)

[0204] En un esfuerzo por identificar las regiones de epítipo de IL-21 reconocidas mediante la neutralización de mAb anti-IL-21 362.78.1.44, 362.597.3, 366.328.10, 366.552.11 y hIL-21R/ γ c-Fc soluble se aplicó un método de intercambio de deuterio e hidrógeno a base de inmunoafinidad (HDx) seguido por análisis de espectrometría de masas. Específicamente, los mAb purificados se inmovilizaron sobre microesferas de sefarsa activadas con CNBr e intercambian en tampón de deuterio. La IL-21 deuterada se unió a las microesferas de inmunoafinidad por incubación y las microesferas se lavaron con tampón deuterado para eliminar las proteínas no unidas. A continuación, el complejo antígeno-anticuerpo se sometió a la solución de PBS para iniciar el retro-intercambio a hidrógeno de amida en las regiones no unidas de IL-21. A continuación, se detuvo el intercambio de hidrógeno y deuterio y la IL-21 se eluyó en tampón de pH bajo, que después se sometió a digestión proteolítica por pepsina inmovilizada. A continuación, se generaron mapas de masas de péptidos por espectrometría de masas MALDI-TOF y se compararon con la de la muestra de control, generada a partir del estado libre de IL-21, que se retrointercambió a hidrógeno de amida de la IL-21 deuterada por dilución con solución de PBS. La figura 3 muestra espectros de masas expandidos de péptidos digeridos con pepsina del estado libre de IL-21 (Figuras 3A y 3C) y el anticuerpo unido a IL-

21 (Figura 3B y 3D). Como se indica en la figura 3A, los isótopos de péptidos solapantes fueron asignados a péptidos correspondientes EKKPPKEF (SEQ ID NO: 2 desde el residuo 129 a 136) (m/z, 1002,5619 Da) y LERFKSLL (SEQ ID NO: 2 desde el residuo 137 a 144) (m/z, 1005.6091 Da) del estado libre de la IL-21 con las masas peptídicas teóricas dentro precisión en masa de 10 ppm. Se observó una pequeña cantidad de péptido deuterado residual alrededor de m/z, 1002,5619 Da, debido al intercambio de hidrógeno de amida incompleto.

[0205] La Figura 3B es un espectro de la misma rango de masas de la figura 3A que muestra las dos cubiertas de isótopos de péptidos superpuestos que tienen iones monoisótopo en m/z 1014,49 y 1015,00. Debido a que dos iones de péptidos se agruparon alrededor del mismo rango de masas, era difícil asignar cada identidad de péptido entre los dos iones. Sin embargo, los datos de espectrometría de masas en tándem de los iones peptídicos de la Figura 3A y B mostraron que tenían patrones de fragmentación de péptido idénticos (datos no mostrados). Aunque hubo un pequeño porcentaje de péptido no deuterado detectado de la muestra obtenida del complejo antígeno-anticuerpo, la mayoría de los iones de péptidos retuvieron deuterio y se desplazaron a la región de mayor masa debido a la accesibilidad de disolvente limitada a las regiones de unión anticuerpo/antígeno, lo que indica que el sitio de unión a mAb probablemente contiene la región EKKPPKEFLERFKSLL (SEQ ID NO: 2 desde el residuo 129 a 144).

[0206] Se observó otro péptido digerido por pepsina del estado libre de IL-21 y del complejo antígeno-anticuerpo, como se muestra en las figuras 3C y D y se identifican como KSLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO: 2 desde el residuo 141 a 162) (m/z, 2519,2451), basado en la masa teórica de fragmento de péptido digerido por pepsina de IL-21. Como se muestra en la Figura 3D, comparando el desplazamiento de masa de este péptido de 22 residuos de aminoácido (Δ masa DELTA = 9,0 Da) con el desplazamiento de masa de estos dos residuos aguas arriba (Figura 2B, EKKPPKEF (SEQ ID. No: 2 desde el residuo 129 a 136) y LERFKSLL (SEQ ID NO: 2 desde el residuo 137 a 144), esta región estaba sólo marginalmente protegida tras la unión del mAb, lo que indica que sólo una parte de este péptido puede estar implicado en la unión al mAb. De hecho, esta secuencia peptídica es la cola C-terminal y contiene cuatro residuos de aminoácido solapantes con el péptido (LERFKSLL (SEQ ID NO: 2 desde el residuo 137 a 144), que parecían estar protegidos de manera significativa por el mAb. En base a estas mediciones de espectrometría de masas de retención de deuterio, se estimó que el epítipo de IL-21 para la unión del mAb EKKPPKEFLERFKSLL (SEQ ID NO: 2 desde el residuo 129 a 144) y la secuencia aguas arriba de KSLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO: 2 desde el residuo 141 a 162).

B. Experimento de protección de etiquetado de lisina

[0207] Usando el ensayo HDx, se estimó la región epítipo de unión a mAb de IL-21 y se observó que cinco residuos de lisina (de un total de 12 residuos de lisina en la IL-21) residen en la región de epítipo de unión estimada. Dado que los residuos de lisina son los más propensos a estar presentes en regiones accesibles al disolvente de las proteínas debido a su característica cargada, la lisina parece ser una elección ideal para la modificación química selectiva para una determinación paralela de la región epítipo del antígeno. El concepto detrás de la estrategia de modificación química es que la protección de la modificación de lisina en un antígeno en presencia y ausencia de anticuerpo se correlaciona a su epítipo de unión (Scholten et al, J. Amer Soc Mass Spectr 17: 983-994, 2006). Por lo tanto, para una caracterización adicional de la región de epítipo y para la determinación de los residuos de lisina que participan en la unión del mAb, se llevó a cabo una acetilación selectiva en los residuos de lisina en los estados unidos o libres de IL-21. El sitio de modificación/protección de lisina se determinó por los análisis de masa entera y mapeo de péptidos mediante MALDI-TOF y espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI).

[0208] Scholten et al, (Scholten et al, J. Amer Soc Mass Spectr 17: 983-994, 2006) investigaron la relación molar entre el reactivo de acetilación (NHS-acetato) y un antígeno para la completa acetilación de residuos de lisina accesible al disolvente y se encontró que el etiquetado fue eficaz en exceso molar de 250 veces del reactivo en reacción de 3 min. Para determinar el epítipo de unión, se empleó la misma condición de marcaje de reacción, tanto para el estado libre de IL-21 como la IL-21 unido por afinidad con varios mAbs neutralizantes de IL-21, así como la proteína receptora heterodimérica de IL-21 (IL-21R γ C-Fc). Con la condición de marcaje de reacción determinada, la diferente accesibilidad al disolvente de los restos de lisina de la IL-21 solo y la IL-21 unido por afinidad dio lugar a la distribución de la acetilación de lisina (ocupación de acetilo) en la molécula de IL-21. El número de residuos de lisina protegidos en la IL-21 unidad por afinidad se comparó con la IL-21 sola por el ión más intenso. La alineación espectral basada en los iones más intensos mostró claramente que el número de acetilaciones de lisina en los antígenos aislados de diferentes complejos inmunes es variado. Era evidente que el reactivo de marcaje de lisina era menos accesible en la IL-21 unidad por afinidad. Por lo tanto, la acetilación se redujo mediante la unión del antígeno al anticuerpo.

[0209] Las lisinas protegidas por acetilación, que pueden estar implicadas en la unión de mAb, se sondaron adicionalmente por digestión con proteasas, y seguido por el análisis de mapeo de masas del péptido mediante espectrometría de masas con cromatografía líquida. Dado que los residuos de lisina covalentemente modificados son resistentes a la digestión triptica, se utilizó la enzima proteolítica de pepsina para generar más péptidos detectables por espectrometría de masas para estudiar la modificación de lisina en más detalle. Se investigó la modificación de péptidos individuales mediante cromatografía iónica de un único péptido. Como se muestra en la Figura 4, se generaron cromatogramas de iones seleccionados a partir del control (IL-21 sola) y muestras de prueba

(moléculas de IL-21 unidas por afinidad) para determinar los residuos de lisina acetilados y no acetilados. La figura 4A es un cromatograma de iones seleccionados de un péptido proteolítico que eluye a 56,22 min en las condiciones de cromatografía determinadas y la masa del ion de péptido monoisótopo era de 662,9 Da, que parecía estar en un estado triplemente cargado ($\Delta m = 0,3$ Da) tal como se indica en el espectro de masas incorporado. Se realizó la identificación de este péptido en un estado triplemente cargado como el fragmento de péptido de lisina acetilada digerido con pepsina, TCPSCDSYEKKPPKEF (SEQ ID NO: 2 desde el residuo 119 a 136) (m/z, 1986 Da (m/z), mientras que la masa del péptido no acetilado es 1860 Da (m/z). La diferencia de masa (péptido acetilado/ péptido no acetilado) fue de 126 Da, lo que indica que los tres residuos de lisina en este péptido estaban acetilados en el estado libre de la IL-21. Sin embargo, un cromatograma de iones seleccionado de la IL-21 unida por afinidad no mostró ninguna traza del péptido (Figura 4B), indicando que los tres residuos de lisina estaban completamente protegidos por la unión al anticuerpo IL-21.

[0210] Se encontró que péptido adicional digerido por pepsina (KSLQKMI (SEQ ID NO: 2 desde el residuo 141 a 148) estaba protegido después de la unión de mAb de IL-21 (figura 4C y 4D). Su ion monoisotópico estaba a 509 Da (m/z) como un ion doblemente cargado ($\Delta m = 0,5$ da) y la diferencia de masa (péptido acetilado/péptido no acetilado) fue de 42 Da, lo que indica que sólo uno de los dos residuos de lisina en este péptido estaba protegido. Los experimentos de intercambio de H/D anteriores indicaron que la lisina aguas arriba de la cola C-terminal de la secuencia del péptido, KSLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO: 2 desde el residuo 141 a 162), estaba muy probable protegida por la unión del anticuerpo. Por lo tanto, lo más probable es que K113 en lugar de K119 esté implicado en la unión del anticuerpo.

[0211] Se protegieron cuatro residuos de lisina (K102, K103, K106 y K113) de la acetilación por la unión de los clones 362.78.1.44 y 362.597.3 y estaban situados dentro de la región de epítipo de unión a mAb de IL-21 determinada como se determina a partir del ensayo HDX. En conjunto, el ensayo de protección por acetilación proporcionó la implicación de los residuos de lisina específicos en la interacción antígeno-anticuerpo y confirmó además la secuencia de epítipo estimada a partir del ensayo de HDX.

17C.-Comparación de las secuencias de aminoácidos de IL-21 de varias especies

[0212] Para comprender mejor los resultados de reactividad cruzada de especie en los ejemplos 3 y 9, a la luz de los epítopos definidos en IL-21 unido por los mAb de IL-21 (Ejemplo 17A y B), se obtuvieron y compararon las secuencias de aminoácidos de IL-21 a través de múltiples especies (Tabla 13). La secuencia humana global fue más de 96% idéntica a secuencias de mono cynomolgus y mono rhesus, mientras que sólo el 61-65% idéntica a las secuencias de IL-21 de roedor. En particular, el epítipo discontinuo unido por clones 362.78.1.44 y 362.597.3 como se describe en el Ejemplo 17 (subrayado en la Tabla 13) es idéntico en IL-21 humano, de cynomolgus y rhesus, mientras que la secuencia de IL-21 de rata difiere de IL-21 humana en 6 residuos en estas regiones, y la secuencia de IL-21 de ratón se diferencia en 7 residuos.

[0213]

Tabla 13: Alineación de secuencias de aminoácidos de IL-21 para IL-21 de ser humano, mono cynomolgus, mono rhesus, rata y ratón.

Hu IL-21	MRSSPGNMERIVICLMVIFLGLTVHKSSS QGQDRHMIRHMRQLIDIVDQLKKNYVNDLV
CynoIL-21	MRSSPGNMERIVICLMVIFLGLTVHKSSS QGQDRHMIRIMRQLIDIVDQLKKNYVNDLD
RhesusIL-21	MRSSPGNMERIVICLMVIFLGLTVHKSSS QGQDRHMIRMRQLIDIVDQLKQLYVNDLD
Rat IL-21	MERTLVCLILIFLGTVAHKSSP QRPDHLIRLRHLMDIVEQLKIYENDLD
MuIL-21	MERTLVCLVVIFLGTVAHKSSP QGPDRLLIRLRHLIDIVEQLKIYENDLD
Hu	PEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIIKLLKRKPP
Cyno	PEFLPAPEDVETNCEWSAISCFQKAQLKSANTGNNERIINLSIIKLLKRKSP
Rh	PEFLPAPEDVETNCEWSAISCFQKAQLKSANTGNNERIINLSIIKLLKRKSP
Rat	PELLTAPQDVKGQCEHEAFACFQKAKLKPSNTGNNKTFINDLLAQLRRRLP
Mu	PELLSAPQDVKGHCEHAAAFACFQKAKLKPSNPGNNKTFIIDLVAQLRRRLP
Hu	STNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS
Cyno	STGAERRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS
Rh	STGAERRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS
Rat	AKRTGNKQRHMAKCPSCDLYEKKTPKEFLERLKWLLQKMIHQHLS
Mu	ARRGGKKQKHIKCPSCDSYEKRTPKEFLERLKWLLQKMIHQHLS

[0214] IL-21 humana se muestra como SEQ ID NO: 2; IL-21 de ratón se muestra como SEQ ID NO: 11; IL-21 de cynomylous se muestra como SEQ ID NO: 9; IL-21 de rhesus se muestra como SEQ ID NO: 9; IL-21 de rata se muestra como SEQ ID NO: 97.

5 **[0215]** El epítipo discontinuo determina por dos mAb anti-hIL-21 362.78.1 y 362.597.3 altamente relacionados está subrayado anteriormente.

Ejemplo 18 Anticuerpos monoclonales anti-idiotipo a 362.78-CHO para su uso en inmunoensayos preclínicos y clínicos.

10 **[0216]** Se generaron mAb anti-idiotipo específicos para 362.78-CHO para su aplicación en inmunoensayos preclínicos y clínicos, de manera que se pueden medir específicamente potenciales respuesta de anticuerpo anti-362.78-CHO en los individuos tratados con este mAb terapéutico anti-IL-21.

15 **[0217]** Para distinguir entre el inmunógeno (362.78-CHO), que es en sí un anticuerpo, y los anticuerpos anti-idiotipo en este ejemplo, el inmunógeno se designará como Ab1 y un anticuerpo anti-idiotipo se designará como Ab2. Un anticuerpo anti-idiotípico debería inhibir (neutralizar) la unión del Ab1 a su antígeno (IL-21). Sin embargo, hay que señalar que en el proceso, los anticuerpos anti-Ab1 serán generados de manera que no son anti-idiotípico. Por definición, estos serán anticuerpos no neutralizantes de unión anti-362.78-CHO y también pueden ser de utilidad en los inmunoensayos preclínicos y clínicos.

20 **[0218]** Métodos: para inmunizar ratones con 362.78-CHO, cinco ratones Balb/c de 6 a 8 semanas (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) fueron inmunizados con 362.78-CHO. Los ratones se inmunizaron inicialmente por inyección subcutánea con ~ 50 ug de 362.78-CHO purificado (Lote # A2125F) en combinación con adyuvante Emulsigen®-P (MVP Laboratories Inc, Omaha, NE) según las instrucciones del fabricante. Después de la inmunización inicial, cada uno de los ratones recibieron 50 ug adicionales de 362.78-CHO en adyuvante Emulsigen®-P por vía subcutánea cada dos semanas durante un período de seis semanas. Siete días después de la tercera y cuarta inmunización se extrajo sangre de los ratones a través del plexo retroorbital y se separó el suero de la sangre para el análisis de su capacidad para unirse a 362.78-CHO.

25 **[0219]** La selección de animales de fusión usando tanto un ensayo de captura como un ensayo de neutralización:

30 **[0220]** Ensayo de captura: La capacidad de los anticuerpos anti-362.78-CHO de ratón (Ab2, anti-idiotipo) en los antisueros para unirse a 362.78-CHO (Ab1, producida en células CHO, lote # E10569) se evaluó usando un ensayo de ELISA de tipo captura. En este ensayo, se recubrieron pocillos de placas de ELISA de poliestireno de 96 pocillos primero con 100 µl/pocillo de anticuerpos específico Fc, IgG de cabra anti-humana, (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) a una concentración de 1 µg/mL en tampón de recubrimiento (0,1 M Na₂CO₃, pH 9,6). Las placas se incubaron durante la noche a 4°C, después de lo cual se aspiró el anticuerpo no unido y se lavaron las placas dos veces con 300 µl/pocillo de tampón de lavado (PBS-Tween definido como NaCl 0,137M, KCl 0,0022M, 0,0067 M de Na₂HPO₄, 0,0020 M KH₂PO₄, 0,05% v/p polisorbato 20, pH 7,2). Los pocillos se bloquearon con 200 µL/pocillo de tampón de bloqueo (PBS-Tween, más 1% p/v de albúmina de suero bovino (BSA) durante 60 minutos a temperatura ambiente (RT), se aspiraron y las placas se lavaron dos veces con 300 µl/pocillo de PBS-Tween. Los pocillos se incubaron con 362.78-CHO (Ab1, ZGI producido en células CHO, lote # E10569) a una concentración de 1 µg/ml (en 1% de BSA en PBS-Tween). Después de 1 hora de incubación a RT, los pocillos se aspiraron y las placas se lavaron dos veces como se describe anteriormente. Se prepararon diluciones en serie de 10 veces (en 1% de BSA en PBS-Tween) de los antisueros (Ab2) a partir de una dilución inicial de 1:1000 y que varían hasta 1:1.000.000. Las muestras duplicadas de cada dilución se transfirieron entonces a la placa de ensayo, 100 µl/pocillo. Los sueros normales de ratón sirvieron como control negativo. Tras una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, los pocillos se aspiraron y las placas se lavaron dos veces como se ha descrito anteriormente. A continuación se añadió a los pocillos, 100 µl/pocillo anticuerpo conjugado a HRP específico de Fc de IgG anti-ratón de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories) a una dilución de 1:5000. Tras una incubación de 1 hora a RT, se aspiró el anticuerpo de detección no unido se aspiró de los pocillos y las placas se lavaron dos veces. Después de la aspiración, se añadió 100 ul/pocillo de tetrametil bencidina (TMB) (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 1 minuto a temperatura ambiente. El revelado de color se detuvo mediante la adición de 100 ul/pocillo de reactivo de parada (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y los valores de absorbancia de los pocillos se leyeron en un instrumento de Molecular Devices Spectra MAX 340 a 450 nm.

35 **[0221]** Ensayo de Neutralización: La capacidad de los anticuerpos de ratón anti-362.78-CHO anti-idiotipo (Ab2) en los antisueros para inhibir (neutralizar) la actividad de unión de 362.78-CHO (Ab1) se evaluó mediante un ensayo de neutralización basado placa. En este ensayo, los pocillos de placas de ELISA de poliestireno de 96 pocillos se recubrieron primero con 100 ul/pocillo de ligando de IL-21 humana (lote # A1207F) a una concentración de 1 µg/ml en Tampón de Recubrimiento (0,1 M Na₂CO₃, pH 9,6). Las placas se incubaron durante la noche a 4°C, después de lo cual se aspiró el ligando no unido y se lavaron las placas dos veces con 300 ul/pocillo de tampón de lavado (PBS-Tween definido como 0,137M NaCl, KCl 0,0022M, 0,0067M Na₂HPO₄, 0,0020M KH₂PO₄, 0,05% v/p polisorbato 20, pH 7,2). Los pocillos se bloquearon con 200 ul/pocillo de tampón de bloqueo (PBS-Tween, más 1% p/v albúmina de

60 65

suero bovino (BSA)) durante 1 hora, después de lo cual las placas se lavaron dos veces con tampón de lavado. Se prepararon diluciones en serie de 10 veces (en 1% de BSA en PBS-Tween) de los antisueros (Ab2) con una dilución inicial de 1:100 y que variaban hasta 1:100.000. Los sueros normales de ratón sirvieron como control negativo. Las muestras duplicadas de cada dilución se transfirieron a una placa de dilución de 96 pocillos, 100 uL/pocillo. Ab1 se añadió como una solución 2x, 100 ul/pocillo. Tras una incubación de 45 minutos a RT, se transfirieron 100 ul/pocillo a la placa de ensayo después de aspirar el tampón de bloqueo. Tras una incubación de 1 hora a temperatura ambiente, los pocillos se aspiraron y las placas se lavaron dos veces como se describe anteriormente. A continuación se añadió a los pocillos, 100 µl/pocillo de anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano picante específico de Fc de IgG anti-ratón de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) a una dilución de 1:5000, y las placas se incubaron a RT durante 1 hora. Tras la eliminación del anticuerpo de detección no unido, las placas se lavaron dos veces, se añadieron 100 uL/pocillo de tetrametilbencidina (TMB) (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 2 minutos a RT. El revelado de color se detuvo mediante la adición de 100 ul/pocillo de reactivo de parada (BioFX Laboratories, Owings Mills, MD) y los valores de absorbancia de los pocillos se leyeron en un instrumento de Molecular Devices Spectra MAX 340 a 450 nm.

[0222] Fusión: Se inmunizaron dos ratones con los títulos más altos de neutralización anti-362.78-CHO una última vez con aproximadamente 50 ug de 362.78-CHO (Ab1) en PBS sin adyuvante por vía subcutánea. Cuatro días más tarde, se recogieron el bazo y los ganglios de estos ratones. Se realizó electrofusión utilizando métodos estándar conocidos en la técnica para fusionar los linfocitos con células de mieloma de ratón P3-X63-Ag8.653 (American Type Culture Collection, CRL 1580) en una relación linfocitos:mieloma 1:1, utilizando el aparato Cyto-pulse CEEF-50 (Cyto Pulse Sciences Inc., Glen Burnie, MD). La mezcla de fusión se distribuyó en placas de 96 pocillos de base plana. Los pocillos de las placas de fusión se alimentaron tres veces con un reemplazo de 70% de medio de crecimiento de hibridoma (IMDM con 1x L-glutamina (100x), 1x penicilina-estreptomina (100x), todos de Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, 10% de suero Fetalclone1, no inactivado por calor (Hyclone, Logan, UT), 10% de factor de clonación de hibridoma (BM Condimed HI Roche Diagnostic, Indianapolis, IN), suplemento HAT 1x (50x, Gibco Invitrogen). Los pocillos se ensayaron diez días después de la siembra de la fusión.

[0223] Selección de pocillos madre: Las placas de fusión de 96 pocillos fueron seleccionadas para la presencia de anticuerpos de idiotipo anti-362.78-CHO de ratón utilizando un ELISA de estilo de captura como se ha descrito anteriormente, excepto que los sobrenadantes de hibridoma se ensayaron sin diluir de las placas de cultivo. Las células de hibridoma de los pocillos positivos se expandieron con éxito en el cultivo en placas de 24 pocillos. Cuando la densidad de los cultivos de 24 pocillos fue de aproximadamente $4-6 \times 10^5$ células/ml, el sobrenadante (aproximadamente 1,5 ml) se recogió y se almacenó de forma individual para cada pocillo y las células de cada pocillo se crioconservaron. El medio de congelación consistía en 90% de suero Fetalclone 1 y 10% de DMSO. Cada uno de los sobrenadantes de los 24 pocillos se volvieron a analizar, tanto en el ELISA de captura como el ensayo de ELISA de neutralización basado en placa descrito anteriormente. Los resultados indicaron que después de la expansión, todos los sobrenadantes de los pocillos madre habían conservado su capacidad de reconocer el anticuerpo 362.78-CHO (Ab1) en solución. Siete de los sobrenadantes de pocillos madre retuvieron su capacidad para neutralizar la unión de Ab1 a ligando IL-21 humano.

[0224] Clonación: Las células de 5 pocillos madre fueron elegidos de acuerdo a su actividad neutralizante y se clonaron en medio de crecimiento de hibridoma suplementado con 1x HT (100x, Gibco Invitrogen) con el fin de aislar un hibridoma clonal que produce el mAb neutralizante de interés. Las células se clonaron en placas de cultivo celular de microtitulación de 96 pocillos usando una aproximación de dilución de baja densidad estándar (menos de 1 célula por pocillo) y se evaluó la monoclonalidad por examen microscópico de pocillos para un solo foco de crecimiento antes del ensayo. Seis días después de la siembra, todas las placas se cribaron mediante ELISA de neutralización para anticuerpos anti-362.78-CHO anti-idiotipo inhibidores. Las células de hibridoma de los pocillos positivos se expandieron con éxito en placas de 24 pocillos.

[0225] Selección de clones de primera ronda: Los sobrenadantes de aproximadamente 6 pocillos de cada línea de hibridoma clonada que fueron positivos para mAb específico y originados de pocillos con una única colonia de crecimiento de hibridoma se obtuvieron de cada grupo de clonación y se volvieron a cribar a diversas diluciones en el ELISA de neutralización para identificar un mejor clon que produce mAb neutralizante. Cuando la densidad de un mejor clon de los cultivos de 24 pocillos fue de aproximadamente $4-6 \times 10^5$ células/ml, el sobrenadante se recogió de forma individual y se almacenó para cada pocillo y las células de cada pocillo se crioconservaron.

[0226] Resumen: se generaron anticuerpos monoclonales de ratón (Ab2) reactivos contra el anticuerpo expresado recombinantemente 362.78-CHO (Ab1) y presentan actividad neutralizante capaz de bloquear la unión del anticuerpo 362.78-CHO a IL-21 humana. Estos anticuerpos se pueden utilizar como reactivos en inmunoensayos preclínicos y clínicos.

Ejemplo La unión de IL-21 nativa intracelular humana y de mono cynomolgus (pero no IL-21 de ratón o rata) por mAb de IL-21 362.78.1.44

[0227] Los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 neutralizantes descritos en este documento fueron generados a

partir de ratones transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana y se inmunizaron con IL-21 humana recombinante (ver Ejemplo 1). Era importante confirmar que el clon de mAb de IL-21 362.78.1.44 se puede unir y neutralizar la IL-21 humana nativa, además de la forma recombinante de la IL-21. Además, con el fin de apoyar los estudios de toxicología preclínicos, es útil entender la capacidad de unión del clon de mAb de IL-21 362.78.1.44 a la IL-21 en una variedad de especies. Para probar esto, una estrategia es marcar el clon de mAb de IL-21 362.78.1.44 con un colorante fluorescente y utilizarlo para detectar IL-21 intracelular en células T activadas por citometría de flujo. En este estudio, se activaron in vitro leucocitos de sangre periférica recién aisladas de humano y de cynomolgus monkey, así como esplenocitos de rata y ratón, con PMA y ionomicina durante 24 horas para inducir la producción de IL-21. Se recogieron las células, se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron para la expresión de CD3 o CD4 (para definir poblaciones de células T auxiliares) y IL-21 usando el clon de mAb de IL-21 362.78.1.44 marcado con ALEXA FLUOR-647 (AF-647), y se comparó con la intensidad de la tinción inducida por un anticuerpo de control de isotipo coincidente. Una señal positiva en este ensayo, por encima de la observada para el mAb de control de isotipo, demuestra la unión específica del clon de mAb de IL-21 362.78.1.44 a IL-21 endógena en la especie de ensayo, aunque no es un indicador de la actividad neutralizante de IL-21. Se requieren más estudios para demostrar la neutralización de IL-21 en una especie que da positivo para la unión de IL-21 con el clon de mAb anti-IL-21 humana 362.78.1.44 (véase el ejemplo 20).

[0228] Aislamiento de PBMC humanas: se recogieron 100 ml de sangre periférica de voluntarios humanos sanos (ZymoGenetics) en tubos Vacutainer de tapa verde con heparina (Becton Dickinson, San Jose, CA). La sangre se diluyó con 100 ml de PBS a temperatura ambiente y se distribuyeron alícuotas de 35 ml en tubos cónicos de 50 ml. Se colocaron en una subcapa 14 ml de Ficoll/Paque PLUS (Farmacia, Uppsala, Suecia) a temperatura ambiente y los tubos se centrifugaron durante 20 minutos a 2000 rpm. La capa de interfase de PBMC se extrajo y se lavó dos veces con medio de ensayo (RPMI 1640 con suplemento de penicilina/estreptomicina, 10% de suero bovino fetal, piruvato sódico, 2 μ M de beta-mercaptoetanol, todos de Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células viables se contaron en azul de tripano usando técnicas estándar.

[0229] Aislamiento de PBMC de mono cynomolgus: se recogieron 40 ml de sangre periférica en tubos Vacutainer de tapa verde con heparina (BD Biosciences) de un mono cynomolgus de la Universidad de Washington en Seattle. La sangre se diluyó con 40 ml de PBS a temperatura ambiente y se distribuyeron alícuotas de 35 ml en tubos cónicos de 50 ml. Se colocaron en una subcapa catorce ml de Ficoll/Paque PLUS (Farmacia, Uppsala, Suecia) a temperatura ambiente y los tubos se centrifugaron durante 25 minutos a 2000 rpm. La capa de interfase de PBMC se eliminó y se lavó dos veces con medio de ensayo (RPMI 1640 con suplemento de penicilina/estreptomicina, 10% de suero bovino fetal, piruvato sódico, 2 μ M de β -mercaptoetanol). Las células viables se contaron en azul de tripano usando técnicas estándar.

[0230] Aislamiento de esplenocitos murinos y de rata: se prepararon esplenocitos de rata y ratón de acuerdo con el siguiente protocolo. Un bazo recién recogido se deshizo suavemente en una suspensión de células individuales utilizando los extremos de dos portaobjetos de vidrio esmerilado. Las células se pasaron entonces a través de un filtro de malla de nylon de 70 μ m para eliminar los grumos. Los glóbulos rojos se lisaron resuspendiendo el sedimento celular en 2 ml de tampón de lisis ACK durante 10 minutos a temperatura ambiente. Esta reacción se detuvo mediante la adición de medio de ensayo, a continuación se centrifugaron las células (1200 rpm durante 5 minutos), se resuspendieron y se pasaron sobre otro filtro de malla de nylon para eliminar los residuos celulares. Las células viables se contaron en azul de tripano usando técnicas estándar.

[0231] Activación durante la noche de las células con PMA e ionomicina: Las células de todas las especies se resuspendieron a 2,0 x 10⁶ células por ml. Se sembró a continuación un ml de células con o sin la adición de 20 ng/ml de PMA y 200 ng/ml de ionomicina en una placa de 24 pocillos y se incubó a 37°C durante 20 horas en un incubador humidificado de cultivo de tejidos con CO₂ al 5%. Después de 20 horas, se añadió 1,0 μ l de GolgiPlug (BD Pharmingen) a cada pocillo y se incubaron las células durante un período adicional de cuatro horas.

[0232] Recogida de células y tinción de superficie: Después de la incubación de 24 horas descrita anteriormente, se recogieron las células, se lavaron con tampón FACS frío y se sembraron a 2,0 x 10⁵ - 5,0 x 10⁵ células por pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos de tejido (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ). Las células fueron teñidas con 1 μ g/ml de uno o más de los siguientes anticuerpos, según el caso: anti-CD4-PE murino, anti-CD3-PE de rata, anti-B220-PE de rata, o anti-CD4-PE de mono, o anti-CD4-PE humana durante 20 minutos en hielo. Las células fueron lavadas dos veces en PBS en la preparación para la fijación.

[0233] Fijación de la célula y permeabilización: Para fijar las células, cada sedimento celular se resuspendió en 200 μ l de paraformaldehído al 2% y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las células se centrifugaron a continuación (5 minutos a 1200 rpm) y los sobrenadantes se aspiraron, y las células se resuspendieron en un tampón de permeabilización [PBS suplementado con 0,1% de saponina (Calbiochem) y 0,5% de BSA (Sigma)] durante 10 minutos a temperatura ambiente.

[0234] Tinción intracelular: Después de la fijación y permeabilización, las células se tiñeron con ~ 1 μ g/ml de uno de los siguientes anticuerpos marcados: anti-IL-21-AF647 de ratón, clon de anti-IL-21 humana 362.78.1.44-AF647

(ambos producidos en ZymoGenetics) o un anticuerpo anti-IL-21-AF647 humana comparador de BD Pharmingen. Las células fueron incubadas a temperatura ambiente en la oscuridad durante 40 minutos. Después de 40 minutos, las células se lavaron dos veces con tampón FACS (HBSS suplementado con 1% de BSA, 2% de suero AB humano y 0,05% HEPES).

[0235] Adquisición y análisis de datos: Al finalizar la tinción y el lavado, las células se resuspendieron en 400 µl de tampón FACS y se recogieron datos utilizando un FACS Calibur (BD Pharmingen) que ejecutaba el software CellQuest. Los datos fueron analizados utilizando el software de análisis de datos de FCS Express (De Novo Software, Los Ángeles, CA).

[0236] Resultados: Detección de IL-21 humana en células T humanas estimuladas con PMA + ionomicina: Mientras que sólo el 0,015% de las células T CD3 + dieron positivo mediante el control de isotipo, aproximadamente el 9% de las células T CD4 + dieron positivo para IL-21 utilizando la el clon de mAb de IL-21 362.78.1.44 marcado con AF-647. La misma fracción de las células IL-21+ se detectó usando el mAb de IL-21 comercialmente disponible de eBiosciences. Esto demuestra que el mAb de IL-21 se puede unir a IL-21 producida de forma endógena en las células T CD4 + humanas.

[0237] Detección de IL-21 de mono cynomolgus en estimularon células mononucleares de sangre periférica estimuladas con PMA + ionomicina: Aproximadamente 3,6% de las células T CD3+ de cyno dieron positivo para IL-21 usando el clon de mAb de IL-21 362.78.1.44 marcado con AF-647, en comparación con 0,1% de positivos utilizando el control de isotipo. Este número es mayor que el detectado usando un mAb anti-IL-21 comercialmente disponible de eBiosciences. Esta discrepancia puede deberse a una afinidad de unión más débil del anticuerpo de eBiosciences para IL-21 de cynomolgus. Estos resultados demuestran que el clon del anticuerpo anti-IL-21 362.78.1.44 se puede unir a IL-21 producido de forma endógena en células T CD3+ de mono Cynomolgus.

[0238] Detección de IL-21 murino en esplenocitos estimulados con PMA + ionomicina: Utilizando un anticuerpo monoclonal anti-IL-21 de rata generado en ZymoGenetics como control positivo, aproximadamente el 13,5% de las células T CD4+ de ratón activadas fueron positivas para IL-21. Sin embargo, como se predijo a partir de las transferencias Western y los ensayos de bioactividad de neutralización que demuestran que el clon de mAb anti-IL-21 362.78.1.44 no se une o neutraliza la IL-21 de ratón (ver los Ejemplos 3 y 9), el clon de mAb anti-IL-21 humana 362.78.1.44 marcado con AF647 no detectó células positivas en IL-21. Esto demuestra una vez más que el clon de mAb anti-IL-21 362.78.1.44 no se une a IL-21 murina.

[0239] Detección de IL-21 de rata en esplenocitos estimulados con PMA + ionomicina: esplenocitos de rata se estimularon durante la noche en presencia de PMA y ionomicina. Estas condiciones de estimulación fueron suficientes para producir células T positivas en IL-21 en las células T murinas, de humano, y mono cynomolgus. En este experimento, ni el mAb anti-IL-21 de ratón ni el clon de mAb anti-IL-21 362.78.1.44 detectaron células que fueron positivas para IL-21. Sin embargo, dado que no había control positivo en este experimento, este resultado negativo no elimina de manera concluyente la posibilidad de que el clon de mAb anti-IL-21 362.78.1.44 se pueda unir a IL-21 de rata. Sin embargo, estos datos, considerados junto con la falta de neutralización de bioactividad de IL-21 de rata por el clon de mAb anti-IL-21 362.78.1.44 en otros ensayos (véase el Ejemplo 9), sugiere fuertemente que este mAb probablemente no se une a IL-21 de rata.

[0240] Conclusión: El clon de mAb de IL-21 362.78.1.44 descrito en este documento claramente se une a las formas nativas de mono cynomolgus y humano de la proteína IL-21, pero no a IL-21 murino o de rata.

Tabla 14

Especies	Isotipo de control	mAb anti-IL-21 humana (clon 78)	Control positivo anti-IL-21
humana	0,015% de células T CD3+ de tinción positiva con un control hIG4-AF647	9% de células T CD3+ fueron IL-21+	10% de células T CD3+ fueron IL-21+ (eBiosciences αIL-21 mAb+)
mono cynomolgus	0,1% de células T CD3+ de tinción positiva con un control hIG4-AF647	3,6% de células T CD3+ fueron IL-21+	0,2% de células T CD3+ fueron ILr21+*
ratón	No se usó isotipo de control	No se detectaron	13,5% de células T CD4+ fueron IL-21+
rata	No se usó isotipo de control	No se detectaron	No disponible

* (este mAb puede no unirse fuertemente a IL-21 de cyno)

Ejemplo Unión y neutralización de la bioactividad de IL-21 humana nativa por el clon 362.78.1.44

[0241] Los anticuerpos monoclonales anti-IL-21 neutralizantes (mAb IL-21) descritos en este documento fueron generados a partir de ratones transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana y se inmunizaron con IL-21 humana recombinante (ver Ejemplo 1). Era importante confirmar que el clon de mAb de IL-21 362.78.1.44 se puede unir y neutralizar la IL-21 humana nativa, además de la forma recombinante de la IL-21. Para demostrar la neutralización de IL-21 nativa, se utilizó el ensayo basado en células Baf3/IL-21R PSTAT descrito previamente (véase el Ejemplo 7) y se utilizaron muestras de medio acondicionado con células T CD4+ activadas como fuente de IL-21 nativa. En este experimento, las muestras de medio acondicionado de células T se preincubaron con cantidades variables de clon de mAb de IL-21 362.78.1.44 y se midió a continuación el nivel de fosforilación de STAT3 inducida por IL-21 (pSTAT3) en los transfectantes Baf3/hIL-21R. La neutralización de la IL-21 se demostró usando muestras de medio acondicionado de células T activadas de cuatro donantes humanos sanos diferentes.

[0242] Aislamiento de PBMC humanas y la generación de muestras de medio acondicionado de células T: se recogieron 100 ml de sangre periférica de 4 voluntarios humanos sanos (ZymoGenetics) en tubos Vacutainer con heparina de tapa verde (Becton Dickinson, San Jose, CA). A continuación, la sangre se diluyó con 100 ml de PBS a temperatura ambiente y se distribuyeron alícuotas de 35 ml en tubos cónicos de 50 ml. Se colocaron en una subcapa 14 ml de Ficoll/Paque PLUS (Pharmacia, Uppsala, Suecia) a temperatura ambiente y los tubos se centrifugaron durante 20 minutos a 2000 rpm. La capa de interfase de PBMC se extrajo y se lavó dos veces con medio de ensayo (RPMI 1640 con suplemento de penicilina/Streptomycin, 10% de suero bovino fetal, piruvato de sodio, 2 μ M de beta-mercaptoetanol, todos de Invitrogen, Carlsbad, CA). Se contaron las células viables en azul de tripano usando técnicas estándar. Las células T se seleccionaron negativamente utilizando un Kit de selección de células T CD4+ humanas de Miltenyi Biotec (Auburn, CA) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Utilizando técnicas de inmunofenotipaje estándar, se determinó posteriormente que las células T CD4+ eran > 95% puras por citometría de flujo. Las células T se incubaron entonces durante tres días a 5×10^5 células por pocillo en una placa de 24 pocillos pre-recubierta con 5,0 μ g/ml de anticuerpo anti-CD3 en medio distorsionador Th1 que contenía 5,0 μ g/ml de anti-IFN γ , 1,0 μ g/ml de anti-CD28 (todos de Becton Dickinson) y 10 ng/ml de IL-12 (R & D Systems, Minneapolis, MN). Después de tres días, se lavaron las células, se sembraron en medios que contienen 25 ng/ml de PMA y 500 ng/ml de ionomicina y se incubaron durante cinco horas a 37°C. Después de cinco horas, se recogieron las muestras de medio acondicionado y se congelaron y almacenaron a -80°C hasta el día del experimento.

[0243] Para estimar la concentración aproximada de IL-21 en las muestras de medio acondicionado de células T, se prepararon diluciones en serie 1:4 y se ensayaron para la inducción de la fosforilación de STAT3 en los transfectantes Baf3/hIL-21R. Siguiendo el protocolo de bioensayo de pSTAT3 de 10 minutos descrito en el Ejemplo 7, la concentración relativa de IL-21 en cada muestra de medio acondicionado se estimó comparando el nivel de pSTAT3 con el generado utilizando una titulación de IL-21 recombinante. Usando estos datos, la concentración de IL-21 en cada una de las cuatro muestras de medio acondicionado se determinó que era entre 5,0 y 10,0 ng/mL.

[0244] Para demostrar la neutralización de la fosforilación de STAT3 inducida por IL-21 nativa, se preincubaron diluciones 1:10 (concentraciones finales de IL-21 entre 0,5 y 1,0 ng/ml) de las cuatro muestras de medio acondicionado de células T durante 30 minutos a 37°C con una dilución en serie 1:4 de clon de mAb de IL-21 362.78.1.44. La concentración del clon 362.78.1.44 varió desde 0,4 hasta 400 ng/mL. Después de 30 minutos, las muestras de medio acondicionado + mAb de IL-21 fueron transferidas a una placa de células Baf3/hIL-21R y se incubaron durante 10 minutos adicionales a 37°C. Después de 10 minutos, las reacciones se pararon con tampón de lavado frío, las células se lisaron y se midió la cantidad de pSTAT3 utilizando el método descrito en el Ejemplo 7.

[0245] En las cuatro muestras de medio acondicionado, el clon de mAb de IL-21 362.78.1.44 neutralizó eficazmente la actividad de IL-21 (datos resumidos en la Tabla 15). Estos datos demuestran claramente eficaz la unión y la neutralización de la IL-21 humana nativa por el clon 362.78.1.44.

Tabla 15: Neutralización de IL-21 nativa por clon de mAb de IL-21 362.78.1.44

Conc. de mAb de IL-21 (ng/ml)	Inducción de pSTAT3 (número de veces sobre la base)			
	Donante 1	Donante 2	Donante 3	Donante 4
0,4	69,49	56,32	61,11	62,73
1,6	79,84	61,73	68,24	65,41
6,25	70,76	10,46	7,51	60,65
25	2,16	1,62	1,70	2,49
100	168	1,43	1,51	1,49
400	159	1,30	1,14	1,51

Ejemplo 21

21A. Estudio de toxicidad piloto con mAb de IL-21 362.78-CHO en monos cynomolgus

[0246] La especificidad de epítipo de mAb de IL-21 362.78-CHO es compartida por los seres humanos, monos rhesus y mono cynomolgus (véanse los Ejemplos 17 y 17b), por lo tanto, la tolerabilidad y la toxicidad de mAb de IL-21 fueron probados en monos cynomolgus, una especie relevante para evaluación de la seguridad.

5 **[0247]** Se trataron monos Cynomolgus con una sola inyección de mAb de IL-21 362.78-CHO y se controlaron los signos clínicos de 4 a 8 semanas después del tratamiento. El mAb de IL-21 fue administrado por inyección subcutánea o intravenosa en dosis de 5 o 100 mg/kg. No se observaron signos clínicos. No se observaron cambios significativos en el peso corporal o la coagulación. No se observaron cambios en la química del suero o la hematología atribuibles a la toxicidad del fármaco. El tratamiento solo con mAb de IL-21 362.78-CHO a 5 o 100 mg/kg fue bien tolerado por todos los animales.

15 **[0248]** La necropsia se realizó en animales a dosis alta (100 mg/kg). No se observaron cambios anatómicos importantes. El análisis histopatológico de los animales a dosis altas mostró hiperplasia linfocítica mínima en los tejidos linfoides. Los análisis de inmunohistoquímica de los tejidos linfoides mostraron un aumento moderado en el tamaño del folículo y en tipos de células asociadas de folículo. Estos cambios podrían relacionarse con la actividad farmacológica de mAb de IL-21 362.78-CHO, ya que se sabe que IL-21 afecta directamente el desarrollo y la salida de las células B de los folículos linfoides y apoyan el cambio de clase, maduración de afinidad y el desarrollo de células plasmáticas.

20 **[0249]** El comportamiento farmacocinético y la biodisponibilidad de mAb de IL-21 362.78-CHO se controló en un estudio de dosis única en monos cynomolgus. Ocho de estos monos fueron tratados con mAb de IL-21 362.78-CHO. Tres fueron tratados mediante inyección subcutánea de 5 mg/kg y tres fueron tratados por inyección intravenosa de 5 mg/kg. Dos fueron tratados por inyección intravenosa de 100 mg/kg. Se tomaron muestras de suero para el análisis de los niveles de mAb de IL-21 362.78-CHO durante cuatro semanas después del tratamiento para el grupo de 100 mg/kg y durante ocho semanas después del tratamiento para los dos grupos 5 mg/kg. El análisis no compartimental de los perfiles farmacocinéticos mostró que la exposición aumentó de manera proporcional a la dosis con la administración intravenosa de 5 o 100 mg/kg de mAb de IL-21. La biodisponibilidad de mAb de IL-21 362.78-CHO fue de aproximadamente el 50% después de la administración subcutánea. La vida media terminal estimada para mAb de IL-21 fue de 10-14 días. La vida media terminal estimada del inserto* de mAb de IL-21: 362.78-CHO en monos cynomolgus fue de 10-14 días.

21B. Estudio de farmacología piloto con 362.78-CHO en monos cynomolgus

35 **[0250]** La especificidad de epítipo de mAb de IL-21 362.78-CHO es compartida por los seres humanos, monos rhesus y macacos cynomolgus (véanse los Ejemplos 17 y 17b), por lo tanto, se analizó la farmacología in vivo de mAb de IL-21 en monos de cynomolgus, una especie relevante para la evaluación farmacodinámica.

40 **[0251]** Se trataron monos Cynomolgus con una sola inyección de mAb de IL-21 362.78-CHO y se controlaron los signos clínicos durante 4 a 8 semanas después del tratamiento. El mAb de IL-21 362.78-CHO se administró por inyección subcutánea o intravenosa en dosis de 5 o 100 mg/kg. Todos los animales fueron controlados por cambios en la composición de leucocitos de sangre periférica por citometría de flujo. No se observaron cambios relacionados con el tratamiento en la concentración de monocitos o células B, en los subgrupos de células T CD4 y CD8, ni en la proporción de células CD4 con respecto a CD8. Se observó una reducción en la concentración de células NK después de la administración de mAb de IL-21 362.78-CHO. En todos los grupos de tratamiento, las células NK de sangre periférica se redujeron a las 24 h después del tratamiento, en relación a los valores basales. En cinco de los ocho animales, los niveles de NK se mantuvieron por debajo del 60% del valor de línea base durante al menos dos semanas. Se requerirá un estudio de confirmación con los controles adecuados para manipular el estrés y otras fuentes de variabilidad en la concentración de células NK de la sangre periférica para confirmar esta observación.

50 Ejemplo 22- El anticuerpo anti-mIL-21 disminuye la incidencia y progresión de la enfermedad en modelo de artritis inducida por colágeno de ratón (CIA)

Modelo de artritis inducida por colágeno de ratón (CIA)

55 **[0252]** Existen varios modelos animales para la artritis reumatoide conocidos en la técnica. Por ejemplo, en el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA), los ratones desarrollan artritis inflamatoria crónica que se parece mucho a la artritis reumatoide humana. Dado que la CIA comparte características inmunológicas y patológicas similares con la AR, esto hace que sea un modelo ideal para la detección de potenciales compuestos antiinflamatorios humanos. El modelo CIA es un modelo bien conocido en ratones que depende tanto de una respuesta inmune, como de una respuesta inflamatoria, para que tenga lugar. La respuesta inmune comprende la interacción de células B y células T CD4+ en respuesta al colágeno, que se da como antígeno, y conduce a la producción de anticuerpos anti-colágeno. La fase inflamatoria es el resultado de respuestas de los tejidos de mediadores de la inflamación, como consecuencia de algunos de estos anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con el colágeno nativo del ratón y que activan la cascada del complemento. Una ventaja en el uso del modelo CIA es que se conocen los mecanismos básicos de la patogénesis. Los epítopos de células T y de células B relevantes en el colágeno de tipo II han sido identificados, y se han determinado varios parámetros inmunológicos

(por ejemplo, hipersensibilidad de tipo retardado y anticuerpo anti-colágeno) e inflamatorios (por ejemplo, citoquinas, quimiocinas, y enzimas que degradan la matriz) relacionados con la artritis mediada por el sistema inmune, y por lo tanto se puede utilizar para evaluar la eficacia del compuesto de ensayo en el modelo CIA (Wooley, Curr Opin Rheum 3: 407-20, 1999; Williams et al, Immunol 89: 9784-788, 1992; Myers et al, Sci Life 61: 1861-1878, 1997; y Wang et al, Immunol. 92: 8955-959, 1995). La eficacia potencial de un mAb de rata anti-IL-21 de ratón producido en ZymoGenetics fue probado en el modelo de CIA, tal como se describe a continuación.

[0253] Se utilizaron ratones DBA/1J machos de diez semanas de vida (Jackson Labs) para la dosificación terapéutica (es decir, como ratones que consiguen la enfermedad establecida). En el día -21, todos los animales recibieron una inyección de cola intradérmica de 100 microlitros de 1 mg/ml de colágeno tipo II de polluelo formulado en adyuvante completo de Freund (preparado por Chondrex, Redmond, WA), y tres semanas más tarde en el día 0 se les dio la misma inyección excepto que preparada en adyuvante incompleto de Freund. Se administró un anticuerpo anti-IL-21 o el vehículo (PBS) como una inyección intraperitoneal cada dos días para un total de 6 dosis tan pronto como el ratón desarrolló la enfermedad establecida. Los ratones (n = 7 por tratamiento) recibieron 0,15 mg de un anticuerpo anti-IL-21 por animal por dosis, o el control del vehículo, PBS (Life Technologies, Rockville, MD). Los animales comenzaron a mostrar síntomas de la artritis después de la segunda inyección de colágeno, con la mayoría de animales desarrollando inflamación en 1-2 semanas. La extensión de la enfermedad se evaluó en cada pata utilizando un calibrador para medir el grosor de la pata, y asignando una puntuación clínica (0-3) a cada pata.

Seguimiento de la enfermedad:

[0254] Los animales pueden comenzar a mostrar signos de inflamación de la pata poco después de la segunda inyección de colágeno, y algunos animales pueden incluso comenzar a tener signos de inflamación del dedo del pie antes de la segunda inyección de colágeno. La mayoría de los animales desarrollan artritis en 1 - 2 semanas desde la inyección de refuerzo, pero algunos pueden requerir un periodo de tiempo más largo. La incidencia de la enfermedad en este modelo es normalmente del 90-100%, y se observan habitualmente 0-5 no respondedores (determinada después de 6 semanas de observación) en un estudio usando 60 animales. Dado que este estudio incluyó solamente los ratones con la enfermedad establecida, los ratones que no desarrollaron artritis no fueron utilizados. Cabe indicar que a medida que comienza la inflamación, puede haber una aparición transitoria común de la pata de bajo grado variable o la inflamación del dedo del pie. Por esta razón, un animal no se considera que tienen la enfermedad establecida hasta desarrollar una inflamación de la pata notable y persistente.

[0255] Todos los animales se observaron diariamente para evaluar el estado de la enfermedad en sus patas, lo que se hizo mediante la asignación de una puntuación clínica cualitativa a cada una de las patas. Todos los días, se puntuó cada animal en sus 4 patas de acuerdo a su estado de enfermedad clínica. Para determinar la puntuación clínica, la pata puede considerarse como que tiene 3 zonas, los dedos de los pies, la pata en sí (manus o pes), y la articulación de la muñeca o el tobillo. El alcance y la gravedad de la inflamación con respecto a estas zonas se tuvo en cuenta, incluyendo: la observación de cada dedo del pie para la hinchazón; uñas rasgadas o enrojecimiento de los dedos de los pies; indicación de cualquier evidencia de edema o enrojecimiento en cualquiera de las patas; indicación de cualquier pérdida de demarcación anatómica fina de tendones o huesos; evaluación de la muñeca o el tobillo para cualquier edema o enrojecimiento; e indicación de si la inflamación se extiende proximalmente hasta la pierna. Una puntuación de pata de 1, 2 ó 3 se basa en primer lugar en la impresión global de la gravedad, y la segunda sobre cómo se involucraron muchas zonas. La escala utilizada para la puntuación clínica se muestra a continuación.

Puntuación clínica:

[0256]

0 = Normal

0,5 = Uno o más dedos implicados, pero sólo los dedos de los pies están inflamados

1 = leve inflamación que implica la pata (1 zona), y pueden incluir un dedo o dedos del pie

2 = inflamación moderada en la pata y puede incluir algunos de los dedos de los pies y/o la muñeca/tobillo (2 zonas)

3 = grave inflamación en la pata, muñeca/tobillo, y algunos o todos los dedos de los pies (3 zonas)

[0257] La enfermedad establecida se definió como una puntuación cualitativa de la inflamación de la pata de puntuación 1 o más, que persistió durante dos días seguidos. Una vez establecido que la enfermedad estaba presente, se registró la fecha y se designó como primer día de ese animal con "enfermedad establecida".

[0258] Los ratones que recibieron un anticuerpo anti-mIL-21 se caracterizaron por una reducción en inflamación de la pata en el transcurso del experimento y tenían una puntuación de artritis promedio de aproximadamente 25% menor en comparación con los ratones que recibieron PBS. Estos resultados indican que un anticuerpo anti-mIL-21 redujo la inflamación de la pata y progresión de la enfermedad asociada con este modelo de artritis y sugieren que un anticuerpo anti-IL-21 puede ser eficaz en el tratamiento de la artritis humana.

Ejemplo 23 Expresión de IL-21R en muestras de piel psoriásica humanas

[0259] La expresión de IL-21R se limita generalmente a las células de origen hematopoyético. Sin embargo, en la configuración de la enfermedad inflamatoria, la expresión de IL-21R en las células no hematopoyéticas puede proporcionar un estímulo directo a tipos de células que median los cambios funcionales en los tejidos afectados. En la psoriasis, el crecimiento de queratinocitos está desregulado, con hiperplasia epidérmica psoriaforme, diferenciación terminal aberrante, y el desarrollo incompleto de la capa córnea. La IL-21 producida por la infiltración de células Th1 y Th17 en la piel psoriásica podría promover cambios funcionales en los queratinocitos, incluyendo la proliferación celular, la producción de quimioquinas, y la diferenciación alterada. Por lo tanto, se investigó la presencia de IL-21R en los queratinocitos en lesiones de piel psoriásica.

[0260] Métodos: Se realizó un análisis inmunohistoquímico de 18 muestras de biopsia de piel de 4 donantes humanos normales y 9 pacientes con psoriasis utilizando un anticuerpo IgG1 de ratón contra la IL-21R humana producida en ZymoGenetics. Para los pacientes con psoriasis, un subconjunto (5) proporcionó muestras de la piel tanto lesional como no lesional. Se observó un alto grado de hiperplasia epidérmica en el examen histopatológico de la piel lesional de todos los donantes. La inmunoreactividad (tinción) de IL-21R en determinados tipos de células se obtuvo basándose en la frecuencia de células positivas y la intensidad de la tinción.

[0261] Resultados: En la piel normal y en la piel no lesional de los pacientes con psoriasis, la tinción de IL-21R fue positiva en ocasionales células mononucleares intra-epidérmicas (MNC), macrófagos dispersados y células similares a fibroblastos. La tinción positiva para IL-21R estaba presente en un alto número de MNC en todas las muestras de los pacientes con psoriasis lesional. Las muestras teñidas con un anticuerpo de control de isotipo de ratón fueron negativas. Hubo una tinción mínima o nula de IL-21R en los queratinocitos epidérmicos de la piel normal. En las biopsias de piel no lesional de pacientes con psoriasis, se observó tinción leve en los queratinocitos epidérmicos en 4 muestras, y no se observó tinción moderada en el estrato espinoso en el quinto ejemplo. Hubo una tinción de leve a fuerte de áreas focales de los queratinocitos en las muestras lesionales de 8 de los 9 pacientes con psoriasis.

[0262] Conclusión: En las lesiones de la piel psoriásica, la expresión de IL-21R no se limita a la infiltración de leucocitos, sino también a la regulación por incremento de los queratinocitos epidérmicos. La presencia de mayor tinción de IL-21R en los queratinocitos epidérmicos en la piel no lesionada de pacientes con psoriasis, en comparación con los controles normales, sugiere que incluso en piel no involucrada, los queratinocitos pueden responder de forma aberrante a la estimulación por IL-21. En presencia de inflamación, se observó el aumento de IL-21R en la infiltración de MNC y en la capa epidérmica hiperplásica. Por lo tanto, el tratamiento de la psoriasis con un anticuerpo de bloqueo de IL-21 puede inhibir la inflamación mediante el bloqueo de las señales de IL-21 tanto para las células inflamatorias como para queratinocitos epidérmicos.

Tabla 16: Inmunoreactividad de IL-21R¹ en piel psoriásica normal, no lesionada y lesionada

Tipo de piel (N)	Epidermis ²	MNC ²
Normal (4)	0	1
Psoriasis no lesional (5)	1	1
Psoriasis lesional ³ (9)	2	3

¹ Escala: 0 = ninguno, 1 = leve, 2 = moderado y 3 = fuerte para la expresión de IL-21R

² puntuación mediana de todas las muestras analizadas

³ Cinco de las muestras presentaron biopsias de piel no lesional de donantes emparejados

LISTADO DE SECUENCIAS

[0263]

<110> ZymoGenetics, Inc.
 Jaspers, Stephen R.
 Rixon, Mark W.
 Dillon, Stacey R.
 Ramsdell, Frederick J.
 Krejsa, Cecile M.
 Yi, Eugene C.

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-IL-21 HUMANA

<130> 07-16PCT

<150> 61/012,329

<151> 2007-12-07

<160> 97

<170> FastSEQ for windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 5 gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtacttatga gatccagtcc 60
 10 tggcaacatg gagaggattg tcatctgtct gatggtcac ttcttgggga cactgggtcca 120
 caaatcaagc tcccaaggtc aagatcgcca catgattaga atgctgaac ttatagatat 180
 tgttgatcag ctgaaaaatt atgtgaatga ctgggtccct gaatttctgc cagctccaga 240
 agatgtagag acaaaactgtg agtggctcagc tttttcctgt tttcagaagg cccaactaaa 300
 gtcagcaaat acaggaaaca atgaaaggat aatcaatgta tcaattaaaa agctgaagag 360
 15 gaaaccacct tccacaaatg cagggagaag acagaaacac agactaacat gcccttcatg 420
 tgattcttat gagaaaaaac cacccaaaga attcctagaa agattcaaat cacttctcca 480
 aaagatgatt catcagcatc tgtcctctag aacacacgga agtgaagatt cctgaggatc 540
 taacttgtag ttggacacta tgttacatac tctaataatag tagtgaaagt catttctttg 600
 tattccaagt ggaggagccc tattaaatta tataaagaaa ta 642

<210> 2
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 5 Met Arg Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met
 1 Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln
 20 Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln
 35 Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro
 50 Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln
 65 Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile
 80 Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala
 95 Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr
 110 Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu
 125 Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu
 140 Asp Ser
 155 160

<210> 3
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético IL-21 #1

<400> 3
 5 Glu Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val
 1 Asp Gln Leu Lys Cys
 20

<210> 4
 <211> 19
 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético IL-21 #2

5

<400> 4

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

10

<210> 5
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético IL-21 #3

20

<400> 5

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

25

<210> 6
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético IL-21 #4

35

<400> 6

Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe
 1 5 10 15
 Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser
 20 25

40

<210> 7
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

<220>

<223> IL-21 mutante recombinante aa

50

<400> 7

Met Asp 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

ES 2 584 237 T3

```

    130              135              140
Asp Lys Met Asp His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu
145              150              155              160
Asp Ser

5

<210> 8
<211> 545
10 <212> ADN
    <213> Macaca fascicularis

<400> 8
15 cgagaccaag gtctagctct actgtttgga cttatgagat ccagtcctgg caacatggag 60
    aggatagtca tctgtctgat ggtcatcttc ttggggacac tgggccacaa atcaagctcc 120
    caaggtcaag atcgccacat gattagaatg cgtcaactta tagatattgt tgatcagctg 180
    aaaaattatg tgaatgactt ggaccctgaa tttctgccag ctccagaaga tgtagagaca 240
    aactgtgagt ggtcagctat ttctgtttt cagaaggccc aactaaagtc agcaaataca 300
    ggaacaatg aaaggataat caatttatca attaaaaagc tgaagaggaa atcaccttcc 360
20 acaggtgcag agagaagaca gaaacacaga ctaacatgcc cttcatgtga ttcttatgag 420
    aaaaaaccac ccaagaat cctagaaaga ttcaaatac ttctccaaa gatgattcat 480
    cagcatctgt cctctagaac acatggaagt gaagattcct gaggatctaa cttgcagttg 540
    gacac 545

25 <210> 9
    <211> 162
    <212> PRT
    <213> Macaca fascicularis

30 <400> 9
    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
35 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 Asp Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro
        50          55          60
40 Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Ile 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 Leu Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Ser Pro Ser Thr Gly Ala
        100          105          110
45 Glu 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
50 Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu
    145              150              155              160
    Asp Ser

55 <210> 10
    <211> 3072
    <212> ADN
    <213> Mus Musculus

60 <400> 10
    gagaaccaga ccaaggccct gtcatcagct cctggagact cagttctggt ggcattggaga 60
    ggacccttgt ctgtctggta gtcatcttct tggggacagt ggcccataaa tcaagcccc 120
    aagggccaga tcgcctcctg attagacttc gtcaccttat tgacattgtt gaacagctga 180
    aaatctatga aaatgacttg gatcctgaac ttctatcagc tccacaagat gtaaaggggc 240
65 actgtgagca tgcagctttt gcctgtttt agaaggccaa actcaagcca tcaaaccctg 300
    gaaacaataa gacattcatc attgacctcg tggcccagct caggaggagg ctgcctgcca 360
    ggaggggagg aaagaaacag aagcacatag ctaaatgccc ttctgtgat tcgtatgaga 420
    aaaggacacc caaagaattc ctagaaagac taaaatggct cttcaaaag atgattcatc 480

```

ES 2 584 237 T3

```

agcatctctc ctagaacaca taggacccga agattcctga ggatccgaga agattcccga 540
ggactgagga gacgccggac actatagacg ctcacgaatg caggagtaca tcttgcctct 600
tgggattgca agtggagaag tacgatacgt tatgataaga acaactcaga aaagctatag 660
gttaagatcc tttcgcccat taactaagca gacatttggt ttccctgcac agactccatg 720
5 ctgtcaacac ggaaaatctc aactcaaca gagcccagct tcccgtgtca gggatttctg 780
gtgcttctca agctgtggct tcatcttatt gcccaactgt gacattcttt gattggaag 840
ggaaaactaa agcttttagc aaaaatacag ctagggaatt tgtcgatctg cgagagtaag 900
acctcttatg atcctaacgg aatgatgtaa gctggaaata ataagcataa gatgaaattg 960
aaaattgaag tctttattct ttaagaaaaa cttigtactt gaaagcatgt ctgaagagtt 1020
10 tactcattac cacaaacatc tagcatattg ataactaaca tctttatact ctacaagaga 1080
ggctttccag ataggtacag tttttcttct ctattaggtc tatcaaaatt taacctatta 1140
tgaggggtgc ccttggcttt cactgttttt ctaaagaggc aaggggtgtg taagaagcag 1200
gcttaagttg ctttctctcc aatgtcaagt tcctttataa gctaataggt taatcttgtg 1260
aagatggcaa tgaaagcctg tggaaagtgc aacctcacta tcttctggag ccaagtagaa 1320
15 ttttcaagtt tgtagctctc acctcaagtg gttatgggtg tcttctgatg aatctgctag 1380
ctccagcctc agtctctctc cccacatcct ttcctttctt tcctctttga aacttctaag 1440
aaaaagcaat ccaacaagt tcagcactta agacacattg catgcacac tttgataagt 1500
taaatccaac catctattta aaatcaaaat caggagatga gcaagagac cagaggttct 1560
gttccagttt taaacagact tttactgaac atcccaatct ttaaccaca gaggctaaat 1620
20 tgagcaata gttttgccat ttgatataat ttccaacagt atgtttcaat gtcaagttaa 1680
aaagtctaca aagctatctt ccctggagtg gtatcatcgc ttgagaatt tcttatgggt 1740
aaaatggatc tgagatccaa gcatggcctg ggggatgggt ttgatctaag gaaaaagggt 1800
tctgtacctc acagtgcctt taaaacaagc agagatcccg tgtaccgcc taagatagca 1860
cagactagtg ttaactgatt cccagaaaag tgtcacaatc agaaccaacg cattctctta 1920
25 aactttaaaa atatgtattg caaagaactt gtgtaactgt aatgtgtgta ctgttgatga 1980
cattatacac acatagccca cgtaagtgtc caatgggtgct agcattgggt gctgagttg 2040
ctgctcgaaa gctgaagcag agatgcagtc cttcacaag caatgatgga cagagagggg 2100
agtctccatg ttttattctt ttgttgtttc tggctgtgta actgttgact tcttgacatt 2160
gtgattttta tatttaagac aatgtattta ttttgggtgtg tttattgttc tagcctttta 2220
30 aatcactgac aatttctaata caagaagtac aaataattca atgcagcaca ggctaagagc 2280
ttgtatcgtt tggaaaagcc agtgaaggct tctccactag ccatgggaaa gctacgcttt 2340
agagtaaact agacaaaatt gcacagcagt cttgaacctc tctgtgctca agactcagcc 2400
agtcctttga cattattggt cactgtgggt gggaaacacat tggacctgac aactgttgt 2460
gtgtccatga aggttgccac tgggtgtaag tttttttggt tttcattctc ttatctgtag 2520
35 aacaagaatg tggggctttc ctaagtctat tctgtatttt attctgaact tcgtagtct 2580
gatgtttaat gttttgagta ctcttacagg aacacctgac cacacttttg agttaaat 2640
tatcccaagt gtgatattta gttgttcaaa aagggaaagg atatacatac atacatacat 2700
acatacatac atatataat atatataat atatataat atatataat gtatataat 2760
atatataatag agagagagag agagagagag agagaaagag agagaggttg ttgtagggtca 2820
40 taggagttca gaggaaatca gttatggccg ttaatactgt agctgaaagt gttttcttt 2880
tgaataaatt catagcatta ttgatctatg ttattgtctt gttttattta cagtcacac 2940
tgagaattta gttttaatat gaatgatgta ctttataact taatgattat ttattatgta 3000
tttggttttg aatgtttgtg ttcattggctt cttatttaag acctgatcat attaaatgct 3060
accagctccg ga 3072

```

```

45 <210> 11
    <211> 146
    <212> PRT
    <213> Mus musculus

```

```

50 <400> 11
Met Glu Arg Thr Leu Val Cys Leu Val Val Ile Phe Leu Gly Thr Val
 1      5      10
Ala His Lys Ser Ser Pro Gln Gly Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu
55      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
60      50      55      60
Glu His Ala Ala Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser
65      65      70      75
Asn Pro Gly Asn Asn Lys Thr Phe Ile Ile Asp Leu Val Ala Gln Leu
      80      85      90
Arg Arg Arg Leu Pro Ala Arg Arg Gly Gly Lys Lys Gln Lys His Ile
65      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

```

ES 2 584 237 T3

	130		135		140	
	Leu Ser					
	145					
5	<210> 12 <211> 423 <212> ADN <213> Homo sapiens					
10	<220> <221> CDS <222> (1)...(423)					
15	<400> 12 atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc aga tgg 48 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp 1 5 10 15					
20	gtc ctg tcc cag cta caa ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag 96 Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys 20 25 30					
25	cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc 144 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile 35 40 45					
30	agc agt agg act tac cgc tgg ggc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag 192 Ser Ser Arg Thr Tyr Arg Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys 50 55 60					
35	gaa ctg gag tgg att ggg agt atc tat tat aga ggg agt acc ttc tac 240 Glu Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Phe Tyr 65 70 75 80					
40	aac ccg tcc ctc aag agt cga gtc acc gta tcc gta gac acg tcc aag 288 Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Thr Ser Lys 85 90 95					
45	aac cag ttc tcc ctg aaa ctg agc tct gtg acc gcc gca gac acg gct 336 Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala 100 105 110					
50	gtg tat tac tgt gcg aga cag agt gga tat agt ggc tac gac tgg ttc 384 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Phe 115 120 125					
55	gac ccc tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 423 Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 130 135 140					
60	<210> 13 <211> 141 <212> PRT <213> Homo sapiens					
65	<400> 13 Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp 1 5 10 15 Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys 20 25 30 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile 35 40 45 Ser Ser Arg Thr Tyr Arg Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys 50 55 60 Glu Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Phe Tyr 65 70 75 80					

ES 2 584 237 T3

```

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Thr Ser Lys
                85                90                95
Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala
                100                105
5 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Phe
                115                120                125
Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                130                135                140

10 <210> 14
    <211> 21
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

15 <220>
    <221> CDS
    <222> (1)...(21)

20 <400> 14
    agt agg act tac cgc tgg ggc
    Ser Arg Thr Tyr Arg Trp Gly
    1 5

25 <210> 15
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

30 <400> 15
    Ser Arg Thr Tyr Arg Trp Gly
    1 5

35 <210> 16
    <211> 48
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

40 <220>
    <221> CDS
    <222> (1)...(48)

45 <400> 16
    agt atc tat tat aga ggg agt acc ttc tac aac ccg tcc ctc aag agt
    Ser Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Phe Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
    1 5 10 15

50 <210> 17
    <211> 16
    <212> PRT
    <213> Homo sapiens

55 <400> 17
    Ser Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Phe Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
    1 5 10 15

60 <210> 18
    <211> 36
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

65 <220>
    <221> CDS

```

ES 2 584 237 T3

<222> (1)...(36)

<400> 18
 5 cag agt gga tat agt ggc tac gac tgg ttc gac ccc 36
 Gln Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 19
 10 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 15 Gln Ser Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Trp Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 20
 20 <211> 378
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 25 <221> CDS
 <222> (1)...(378)

<400> 20
 30 atg gaa gcc cca gct cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca 48
 Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

gat acc acc gga gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct 96
 35 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt 144
 40 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

gtt agc agc ttc tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc 192
 45 Val Ser Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc 240
 50 Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80

agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc 288
 55 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

agc cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc 336
 60 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100 105 110

aac tgg atc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa 378
 65 Asn Trp Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 21
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

ES 2 584 237 T3

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

20 <210> 22
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(33)

30 <400> 22
 agg gcc agt cag agt gtt agc agc ttc tta gcc 33
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Phe Leu Ala
 1 5 10

35 <210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 23
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Phe Leu Ala
 1 5 10

45 <210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(21)

55 <400> 24
 gat gca tcc aac agg gcc act 21
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

60 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

65 <400> 25
 Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

ES 2 584 237 T3

<210> 26
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(24)
 10 <400> 26
 cag cag cgt agc aac tgg atc acc 24
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Ile Thr
 1 5
 15
 <210> 27
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 27
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Ile Thr
 1 5
 25
 <210> 28
 <211> 435
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(435)
 35 <400> 28
 atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 40 gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag 96
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 45 cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc 144
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 50 agt agc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg 192
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 55 gag tgg gtg gcg ttt ata tgg tat gat gga agt gat aaa tac tat gca 240
 Glu Trp Val Ala Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 60 gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac 288
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 65 acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg 336
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 70 tat tac tgt gcg aga gat ggg gat agc agt gac tgg tac ggg gac tac 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr
 115 120 125
 75 tac ttc ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc 432

ES 2 584 237 T3

Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 130 135 140
 5 tca 435
 Ser
 145
 <210> 29
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 15 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 20 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 25 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 30 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr
 115 120 125
 Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 130 135 140
 Ser
 145
 35
 <210> 30
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(16)
 45 <400> 30
 agc tat ggc atg cac t 16
 Ser Tyr Gly Met His
 1 5
 50
 <210> 31
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55 <400> 31
 Ser Tyr Gly Met His
 1 5
 60
 <210> 32
 <211> 51
 <212> ADN
 65 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS

ES 2 584 237 T3

<222> (1)...(51)

<400> 32
 5 ttt ata tgg tat gat gga agt gat aaa tac tat gca gac tct gtg aag 48
 Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

ggc 51
 Gly

10

<210> 33
 <211> 17
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 20 Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

25 <210> 34
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(51)

<400> 34
 35 gat ggg gat agc agt gac tgg tac ggg gac tac tac ttc ggt atg gac 48
 Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp
 1 5 10 15

40 gtc 51
 Val

45 <210> 35
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 50 Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Val

55 <210> 36
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

60 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(378)

65 <400> 36
 atg gaa acc cca gcg cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca 48
 Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

ES 2 584 237 T3

gat acc acc gga gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct 96
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30
 5 ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt 144
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 10 gtt agc agc agc tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct 192
 Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 15 ccc agg ctc ctc atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca 240
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 20 gac agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc 288
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 25 agc aga ctg gag cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat 336
 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110
 30 ggt agc tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 378
 Gly Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125
 35 <210> 37
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 37
 Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 45 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 50 Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 55 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 60 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110
 Gly Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125
 65 <210> 38
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 70 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(36)
 75 <400> 38
 agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc tac tta gcc 36
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

ES 2 584 237 T3

5 <210> 39
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 39
 10 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

 15 <210> 40
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(21)

 <400> 40
 25 ggt gca tcc agc agg gcc act 21
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

 30 <210> 41
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 41
 35 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

 40 <210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 45 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(21)

 <400> 42
 50 cag cag tat ggt agc tgg acg 21
 Gln Gln Tyr Gly Ser Trp Thr
 1 5

 55 <210> 43
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 43
 60 Gln Gln Tyr Gly Ser Trp Thr
 1 5

 65 <210> 44
 <211> 435
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <220>

ES 2 584 237 T3

<221> CDS
 <222> (1)...(435)

<400> 44

5	atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt	48
	Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly	
	1 5 10 15	
10	gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gaa tct ggg gga ggc gtg gtc cag	96
	Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln	
	20 25 30	
15	cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc	144
	Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
	35 40 45	
20	agt acc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg	192
	Ser Thr Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	
	50 55 60	
25	gag tgg gtg gcc ttt ata tgg tat gat gga agt gat aaa tac tat gca	240
	Glu Trp Val Ala Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala	
	65 70 75 80	
30	gac tct gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac	288
	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn	
	85 90 95	
35	acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg	336
	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val	
	100 105 110	
40	tat tac tgt gcg aga gat ggg gat agc agt gac tgg tac ggg gac tac	384
	Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr	
	115 120 125	
45	tac ttc ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc	432
	Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser	
	130 135 140	
50	tca	435
	Ser	
	145	

<210> 45
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45

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

ES 2 584 237 T3

```

130                               135                               140
Ser
145

5
<210> 46
<211> 15
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10
<220>
<221> CDS
<222> (1)...(15)

15
<400> 46
acc tat ggc atg cac
Thr Tyr Gly Met His
1 5 15

20
<210> 47
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25
<400> 47
Thr Tyr Gly Met His
1 5

30
<210> 48
<211> 51
<212> ADN
<213> Homo sapiens

35
<220>
<221> CDS
<222> (1)...(51)

40
<400> 48
ttt ata tgg tat gat gga agt gat aaa tac tat gca gac tct gtg aag 48
Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

45
ggc 51
Gly

50
<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

55
<400> 49
Phe Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

60
<210> 50
<211> 51
<212> ADN
65 <213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS

```

ES 2 584 237 T3

<222> (1)...(51)

<400> 50
 5 gat ggg gat agc agt gac tgg tac ggg gac tac tac ttc ggt atg gac 48
 Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp
 1 5 10 15

gtc 51
 Val

10

<210> 51
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 51
 20 Asp Gly Asp Ser Ser Asp Trp Tyr Gly Asp Tyr Tyr Phe Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Val

25 <210> 52
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(378)

35 <400> 52
 atg gaa acc cca gcg cag ctt ctc ttc ctc ctg cta ctc tgg ctc cca 48
 Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

40 gat acc acc gga gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct 96
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30

45 ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt 144
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

50 gtt agc agc agc tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct 192
 Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60

ccc agg ctc ctc atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca 240
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80

55 gac agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc 288
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95

60 agc aga ctg gag cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat 336
 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110

65 ggt agc tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 378
 Gly Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

ES 2 584 237 T3

<210> 53
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 53
 Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 10 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45
 Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 100 105 110
 Gly Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

 25 <210> 54
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(36)
 <400> 54
 35 agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc tac tta gcc 36
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

 40 <210> 55
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 55
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

 50 <210> 56
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 55 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(21)
 <400> 56
 60 ggt gca tcc agc agg gcc act 21
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

 65 <210> 57
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 584 237 T3

```

<400> 57
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1                5
5

<210> 58
<211> 21
<212> ADN
10 <213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(21)
15

<400> 58
cag cag tat ggt agc tgg acg
Gln Gln Tyr Gly Ser Trp Thr
 1                5
20

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

<400> 59
Gln Gln Tyr Gly Ser Trp Thr
 1                5
30

<210> 60
<211> 417
<212> ADN
35 <213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(417)
40

<400> 60
atg gaa ctg ggg ctc cgc tgg gtt ttc ctt gtt gct att tta gaa ggt 48
Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1                5                10                15
45
gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ctg gtc aag 96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
                20                25                30
50
cct ggg ggg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc atc ttc 144
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe
                35                40                45
55
agt agc tat agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg 192
Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
                50                55                60
60
gag tgg gtc tca tcc att act agt ggt agt tat tac ata cac tac gca 240
Glu Trp Val Ser Ser Ile Thr Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile His Tyr Ala
 65                70                75                80
65
gac tca gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac 288
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
                85                90                95
70
tca ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg 336
Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
                100                105                110

```

ES 2 584 237 T3

tat tac tgt gtg aga gag aga gga tgg ggc tac tac ggt atg gac gtc 384
 Tyr Tyr Cys Val Arg Glu Arg Gly Trp Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 115 120 125
 5
 tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 417
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135
 10
 <210> 61
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 61
 Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
 20 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 25 Glu Trp Val Ser Ser Ile Thr Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile His Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 30 Tyr Tyr Cys Val Arg Glu Arg Gly Trp Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135
 35
 <210> 62
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 40
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(15)
 45
 <400> 62
 agc tat agc atg aac 15
 Ser Tyr Ser Met Asn
 1 5
 50
 <210> 63
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55
 <400> 63
 Ser Tyr Ser Met Asn
 1 5
 60
 <210> 64
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 65
 <220>
 <221> CDS

ES 2 584 237 T3

<222> (1)...(51)

<400> 64
 5 tcc att act agt ggt agt tat tac ata cac tac gca gac tca gtg aag 48
 Ser Ile Thr Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

ggc 51
 Gly

10

<210> 65
 <211> 17
 15 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 65
 20 Ser Ile Thr Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

25 <210> 66
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(33)

<400> 66
 35 gag aga gga tgg ggc tac tac ggt atg gac gtc 33
 Glu Arg Gly Trp Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

40 <210> 67
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45 <400> 67
 Glu Arg Gly Trp Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

50 <210> 68
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

55 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(387)

<400> 68
 60 atg gac atg agg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctt ctg ctg ctc tgg 48
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

65 ctc cca ggt gcc aga tgt gcc atc cag ttg acc cag tct cca tcc tcc 96
 Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

ctg tct gca tct gtt gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt 144

ES 2 584 237 T3

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

5 cag gac att gac agt gct tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa 192
 Gln Asp Ile Asp Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

 50 55 60

10 gct cct aag atc ctg atc cat gat gcc tcc agt ttg gaa agt ggg gtc 240
 Ala Pro Lys Ile Leu Ile His Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val

 65 70 75 80

15 cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc 288
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

 85 90 95

20 atc agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag 336
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln

 100 105 110

25 ttt aat agt tac ccg tac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc 384
 Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile

 115 120 125

30 aaa 387
 Lys

35 <210> 69
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 69
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

45 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 Gln Asp Ile Asp Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

50 Ala Pro Lys Ile Leu Ile His Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

55 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110
 Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 115 120 125

60 Lys

65 <210> 70
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

70 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(33)

75 <400> 70
 cgg gca agt cag gac att gac agt gct tta gcc
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asp Ser Ala Leu Ala
 1 5 10

80

<210> 71
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 71
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asp Ser Ala Leu Ala
 1 5 10
 10

 <210> 72
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(21)
 20
 <400> 72
 gat gcc tcc agt ttg gaa agt 21
 Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5
 25

 <210> 73
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens

 <400> 73
 Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5
 35

 <210> 74
 <211> 27
 <212> ADN
 40 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(27)
 45
 <400> 74
 caa cag ttt aat agt tac ccg tac act 27
 Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
 50

 <210> 75
 <211> 9
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens

 <400> 75
 Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
 60

 <210> 76
 <211> 408
 <212> ADN
 65 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> CDS

ES 2 584 237 T3

<222> (1)...(408)

<400> 76

5	atg	aaa	cat	ctg	tgg	ttc	ttc	ctt	ctc	ctg	gtg	gca	gct	ccc	aga	tgg	48
	Met	Lys	His	Leu	Trp	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp	
	1				5					10					15		
10	gtc	ctg	tcc	cag	gta	cag	ctg	cag	gag	tcg	ggc	cca	gga	ctg	gtg	aag	96
	Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	
				20					25					30			
15	cct	tcg	gag	acc	ctg	tcc	ctc	acc	tgc	act	gtc	tct	ggt	ggc	tcc	atc	144
	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	
			35					40					45				
20	agt	agt	gac	ttc	tgg	ggc	tgg	atc	cgg	cag	ccc	cca	ggg	aag	gga	ctg	192
	Ser	Ser	Asp	Phe	Trp	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	
		50				55					60						
25	gag	tgg	att	gga	tat	atc	tct	tcc	cgt	ggg	agc	acc	aac	tac	aac	ccc	240
	Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Ser	Arg	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	
	65					70				75					80		
30	tcc	ctc	aag	agg	cga	gtc	acc	ata	tca	gtc	gac	acg	tcc	agg	aac	cag	288
	Ser	Leu	Lys	Arg	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Arg	Asn	Gln	
					85					90					95		
35	ttc	tcc	ctg	aag	ctg	agc	tct	gtg	acc	gct	gcg	gac	acg	gcc	gtg	tat	336
	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	
				100				105						110			
40	tac	tgt	gcg	aga	tct	gcg	gga	gta	acg	gat	ttt	gac	ttc	tgg	ggc	cag	384
	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Ala	Gly	Val	Thr	Asp	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	
			115					120					125				
45	gga	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tca									408
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
		130					135										

<210> 77
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 77

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

<210> 78
 <211> 15

ES 2 584 237 T3

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <220>
 5 <221> CDS
 <222> (1)...(15)

 <400> 78
 10 agt gac ttc tgg ggc 15
 Ser Asp Phe Trp Gly
 1 5

 <210> 79
 15 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 79
 20 Ser Asp Phe Trp Gly
 1 5

 <210> 80
 25 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <220>
 30 <221> CDS
 <222> (1)...(49)

 <400> 80
 35 tat atc tct tcc cgt ggg agc acc aac tac aac ccc tcc ctc aag agg 48
 Tyr Ile Ser Ser Arg Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Arg
 1 5 10 15

 c 49

 40 <210> 81
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 45 <400> 81
 Tyr Ile Ser Ser Arg Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Arg
 1 5 10 15

 50 <210> 82
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 55 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(27)

 <400> 82
 60 tct gcg gga gta acg gat ttt gac ttc 27
 Ser Ala Gly Val Thr Asp Phe Asp Phe
 1 5

 65 <210> 83
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 584 237 T3

<400> 83
 Ser Ala Gly Val Thr Asp Phe Asp Phe
 1 5
 5

<210> 84
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(387)
 15

<400> 84
 atg gac atg atg gtc ccc gct cag ctc ctg ggg ctc ctg ctg ctc tgg 48
 Met Asp Met Met Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 20

ttc cca ggt tcc aga tgc gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc 96
 Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 25

gtg tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt 144
 Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 30

cag ggt att agc agc tgg tta gcc tgg tat cag cat aaa cca ggg aaa 192
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys
 50 55 60
 35

gcc cct aag ctc ctg atc tat gtt gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc 240
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
 65 70 75 80
 40

cca tca agg ttc agc ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc 288
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95
 45

atc agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt caa cag 336
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110
 50

gct aat agt ttc cct ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc 384
 Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125
 55

aaa 387
 Lys
 60

<210> 85
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 65

<400> 85
 Met Asp Met Met Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Phe Pro Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val

ES 2 584 237 T3

```

65      70      75      80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
      85      90
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
5      100      105      110
Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
      115      120
Lys

10
<210> 86
<211> 33
<212> ADN
15 <213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(33)
20
<400> 86
cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg tta gcc
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1      5      10
25

<210> 87
<211> 11
<212> PRT
30 <213> Homo sapiens

<400> 87
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1      5      10
35

<210> 88
<211> 21
<212> ADN
40 <213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(21)
45
<400> 88
gtt gca tcc agt ttg caa agt
Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1      5
50

<210> 89
<211> 7
<212> PRT
55 <213> Homo sapiens

<400> 89
Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1      5
60

<210> 90
<211> 27
<212> ADN
65 <213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS

```

33

21

<222> (1)...(27)

<400> 90

5 caa cag gct aat agt ttc cct ctc act
 Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
 1 5

27

<210> 91

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

15 Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr
 1 5

<210> 92

20 <211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

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

45

<210> 93

<211> 153

<212> PRT

50 <213> Homo sapiens

<400> 93

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

ES 2 584 237 T3

Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met
 130 135 140
 Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser Ser
 145 150

5

<210> 94
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 94
 Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr
 1 5 10 15
 15 Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
 20 25 30
 Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
 35 40 45
 20 Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
 50 55 60
 Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
 65 70 75 80
 Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
 85 90 95
 25 Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
 100 105
 Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
 115 120 125
 30 Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
 130 135 140
 Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
 145 150 155 160
 Thr Ser

35

<210> 95
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<400> 95
 Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
 1 5 10 15
 45 Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys
 20 25 30
 Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu
 35 40 45
 50 Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe
 50 55 60
 Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe
 65 70 75 80
 Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser
 85 90 95
 55 Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr
 100 105
 Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
 115 120 125
 60 Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
 130 135 140
 Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu
 145 150 155 160
 Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu
 165 170 175
 65 His

ES 2 584 237 T3

<210> 96
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 96
 Met Leu Leu Ala Met Val Leu Thr Ser Ala Leu Leu Leu Cys Ser Val
 1 5 10 15
 Ala Gly Gln Gly Cys Pro Thr Leu Ala Gly Ile Leu Asp Ile Asn Phe
 10 20 30
 Leu Ile Asn Lys Met Gln Glu Asp Pro Ala Ser Lys Cys His Cys Ser
 35 40 45
 Ala Asn Val Thr Ser Cys Leu Cys Leu Gly Ile Pro Ser Asp Asn Cys
 50 55 60
 Thr Arg Pro Cys Phe Ser Glu Arg Leu Ser Gln Met Thr Asn Thr Thr
 15 65 70 75 80
 Met Gln Thr Arg Tyr Pro Leu Ile Phe Ser Arg Val Lys Lys Ser Val
 85 90 95
 Glu Val Leu Lys Asn Asn Lys Cys Pro Tyr Phe Ser Cys Glu Gln Pro
 100 105 110
 Cys Asn Gln Thr Thr Ala Gly Asn Ala Leu Thr Phe Leu Lys Ser Leu
 115 120 125
 Leu Glu Ile Phe Gln Lys Glu Lys Met Arg Gly Met Arg Gly Lys Ile
 130 135 140
 25
 <210> 97
 <211> 146
 <212> PRT
 30 <213> Rattus norvegicus
 <400> 97
 Met Glu Arg Thr Leu Val Cys Leu Ile Leu Ile Phe Leu Gly Thr Val
 1 5 10 15
 Ala His Lys Ser Pro Gln Arg Pro Asp His Leu Leu Ile Arg Leu
 35 20 25 30
 Arg His Leu Met Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp
 35 40 45
 Leu Asp Pro Glu Leu Leu Thr Ala Pro Gln Asp Val Lys Gly Gln Cys
 50 55 60
 Glu His Glu Ala Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser
 65 70 75 80
 Asn Thr Gly Asn Asn Lys Thr Phe Ile Asn Asp Leu Leu Ala Gln Leu
 85 90 95
 Arg Arg Arg Leu Pro Ala Lys Arg Thr Gly Asn Lys Gln Arg His Met
 100 105 110
 Ala Lys Cys Pro Ser Cys Asp Leu Tyr Glu Lys Lys 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
 50
 Leu Ser
 145

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana o fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo comprende:
- 5 (a) una región de cadena pesada que comprende: (i) una CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 31; (ii) una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 33; y (iii) una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 35; y
 (b) una región de cadena ligera que comprende: (i) una CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 39; (ii) una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 41; y (iii) una
 10 CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 43.
2. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, según la reivindicación 1, que comprende los residuos de aminoácido 20 a 145 de la SEQ ID NO: 29 y los residuos de aminoácido 21 a 126 de la SEQ ID NO: 37.
- 15 3. Anticuerpo producido mediante un hibridoma designado como 362.78.1.44, en el que el hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con la designación de depósito bajo patente ATCC PTA-8790.
4. Anticuerpo monoclonal anti-IL-21 humana o un fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo comprende:
- 20 (a) una región de cadena pesada que comprende: (i) una CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 47; (ii) una CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 49; y (iii) una CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 51; y
 (b) una región de cadena ligera que comprende: (i) una CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 55; (ii) una CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 57; y (iii) una
 25 CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 59.
5. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, según la reivindicación 4, que comprende los residuos de aminoácido 20 a 145 de la SEQ ID NO: 45 y los residuos de aminoácido 21 a 126 de la SEQ ID NO: 53.
- 30 6. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, según la reivindicación 4 ó 5, en el que dicho anticuerpo es producido mediante un hibridoma designado como 362.597.3.15, en el que el hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con la designación de depósito bajo patente ATCC PTA-8786.
- 35 7. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo tiene una porción Fc.
8. Anticuerpo, según la reivindicación 7, en el que dicha porción Fc tiene una función efectora reducida.
9. Anticuerpo, según la reivindicación 7, en el que dicha porción Fc se selecciona del grupo que consiste en IgG1, IgG2 e IgG4.
- 40 10. Hibridoma designado como 362.78.1.44, en el que el hibridoma está depositado en la American Type Culture Collection con la designación de depósito bajo patente ATCC PTA-8790.
- 45 11. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para utilizar en medicina.
12. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para utilizar en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), en el que la enfermedad inflamatoria intestinal se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable.
- 50 13. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para utilizar en el tratamiento de la artritis reumatoide.
14. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para utilizar en el tratamiento de la esclerosis múltiple.
- 55 15. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para utilizar en el tratamiento de la diabetes tipo I (DMID).
16. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para utilizar en el tratamiento del síndrome de Sjogren.
- 60 17. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para utilizar en el tratamiento de una enfermedad autoinmune.
- 65 18. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para utilizar, según la reivindicación 17, en el que la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste en: pancreatitis,

- 5 enfermedad inflamatoria de los músculos (polimiositis, dermatomiositis), poliangeítis microscópica, anemia aplásica autoinmune, tiroiditis autoinmune, hepatitis autoinmune, síndrome de Wegener, diverticulosis, espondilitis anquilosante, esclerodermia, esclerosis sistémica, artritis psoriásica, osteoartritis, dermatitis atópica, vitíligo, enfermedad injerto contra huésped (EICH), linfoma cutáneo de células T (LCCT), glomerulonefritis, nefropatía por IgA, pacientes con trasplante altamente sensibilizados, síndrome anti-fosfolípido, uveítis y asma.
- 10 19. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para utilizar en el tratamiento del lupus eritematoso sistémico (LES) o psoriasis.
- 15 20. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para utilizar en el tratamiento de una enfermedad mediada por células T auxiliares foliculares o mediada por células B seleccionada del grupo que consiste en: lupus eritematoso sistémico, pérdida de audición autoinmune, enfermedad de Graves, pénfigo vulgar, miastenia gravis, neuromielitis óptica, síndrome de Goodpasture, nefritis autoinmune, crioglobulinemia, síndrome de Guillain Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (PDIC), anemia hemolítica autoinmune y púrpura trombocitopénica idiopática (PTI).
- 20 21. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para utilizar en el tratamiento de un sujeto con trasplante, en el que se suprime el rechazo del trasplante, se establece tolerancia en el régimen terapéutico pretrasplante o se reducen los títulos de aloanticuerpos títulos en el sujeto.
- 25 22. Anticuerpo o fragmento de anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para utilizar en el tratamiento una enfermedad mediada por células T_H1 o mediada por células T_H17 en un sujeto, en el que la enfermedad mediada por células T_H1 o mediada por células T_H17 se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, espondiloartropatía, artritis reactiva, artritis enteropática, miocarditis autoinmune, enfermedad de Kawasaki, enfermedad celíaca, uveítis, enfermedad de Behcet, enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedad pulmonar intersticial.

Alineación de VH de anticuerpo anti-IL-21

M	E	F	G	L	S	W	V	F	L	V	A	L	L	R	G	V	Q	C	Q	V	Q	L	V	E	S	G	G	V	V	Q	P	G	R	S	L	R	L	S	78	VH								
.	R	I	.	E	E	L	.	K	.	G	597	VH							
.	.	L	.	W	F	F	L	L	.	.	A	P	.	W	.	L	S	.	Q	.	Q	.	Q	.	.	.	P	.	L	.	K	.	S	E	T	.	S	.	328	VH								
.	.	K	H	L	W	F	F	L	L	.	.	A	P	.	W	.	L	S	.	L	.	L	.	L	.	.	P	.	L	.	K	.	S	E	T	.	S	.	552	VH								
.	.	K	H	L	W	F	F	L	L	.	.	A	P	.	W	.	L	S	.	L	.	L	.	L	.	.	P	.	L	.	K	.	S	E	T	.	S	.	75	VH								
C	A	A	S	G	F	T	F	S	30	S	Y	G	M	H	-	-	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	50	F	I	W	Y	D	G	S	D	K	Y	78	VH					
.	I	597	VH		
.	.	T	V	.	.	G	S	I	.	.	.	D	F	W	G	-	-	I	.	.	P	328	VH			
.	.	T	V	.	.	G	S	I	.	.	.	R	T	Y	R	W	G	.	.	.	P	552	VH			
Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	78	VH							
.	597	VH	
.	328	VH		
.	.	N	P	.	L	.	R	.	S	V	.	T	.	.	.	Q	F	S	.	K	L	S	.	V	T	.	A	552	VH				
.	.	N	P	.	L	.	S	.	V	V	.	T	.	.	.	Q	F	S	.	K	L	S	.	V	T	.	A	75	VH				
G	D	S	S	D	W	Y	G	D	Y	F	G	M	D	V	W	103	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S	78	VH
.	597	VH
.	.	R	G	W	G	Y	G	M	-	-	-	-	-	-	-	-	328	VH	
.	.	A	G	V	T	.	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	552	VH		
.	.	S	G	Y	.	G	Y	D	W	F	-	-	-	-	-	-	75	VH		

Definiciones de CDR y numeración de región V según Kabat
 . indica la identidad de secuencia con 78 VH
 - indica una delección insertada para maximizar la homología de secuencia global

Figura 1

Figura 2

Alineación de VL de anti-IL-21

1	M E T P A Q L L F L L L L W L P D T T G E I V L T Q S P G T L S L S P G E R	78 VL
	597 VL
	M D . R V G G A P C A . Q S S . . A . V . D .	328 VL
	M D . M V G F . G S R C D . Q M S S V . A . V . D .	552 VL
 A	75 VL
20	A T L S C I R A S Q S V S S S Y L A I W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y I G A S S R A T I G	78 VL
 - D I D . A K . . R I . . R I D . . L E S .	597 VL
	V . I T - G I . W H . . K . . K V . . . L Q S .	328 VL
 - S V . F D . . N	552 VL
	75 VL
	CDR 1	CDR 2
60	I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C I Q Q Y G S - - W T I	78 VL
	597 VL
	V . S S . Q T F N . Y P Y .	328 VL
	V . S S . Q T A N . F P L .	552 VL
	. . A S R S N - W I .	597 VL
	CDR 3	
105	F G Q G T K V E I K	78 VL
	597 VL
 L	328 VL
	. . G	552 VL
 R L	75 VL

Secuencia señal indicada en rojo
 Definiciones de CDR y numeración de región V según Kabat
 . indica la identidad de secuencia con 78 VL
 - indica una deleción insertada para maximizar la homología de secuencia global

Figura 3

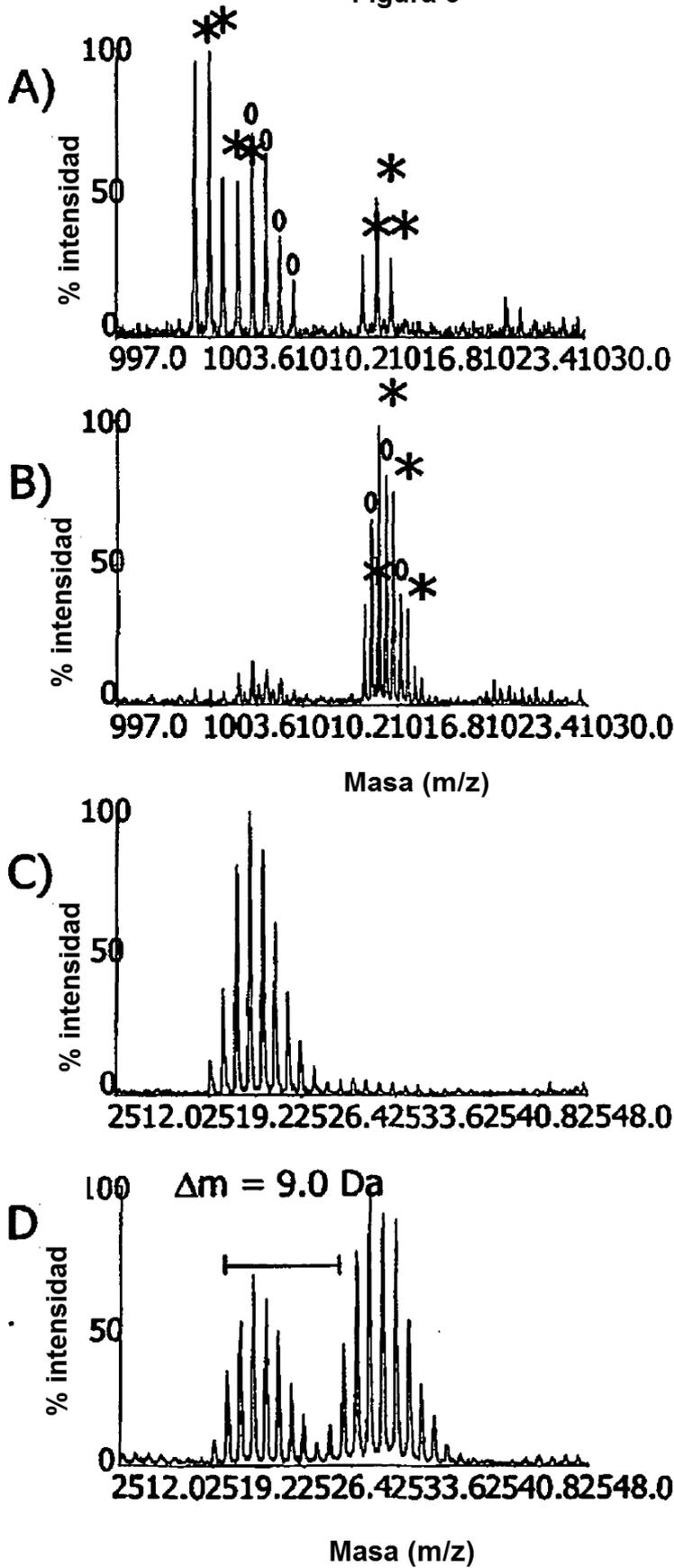


Figura 4

