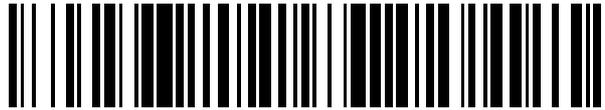


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 395**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2002 PCT/US2002/29839**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2003 WO03028630**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2002 E 02766319 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 1432431**

54 Título: **Métodos y composiciones para modular la actividad de la interleucina-21**

30 Prioridad:

04.10.2001 US 972218
17.04.2002 US 373746 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.08.2017

73 Titular/es:

GENETICS INSTITUTE, LLC (100.0%)
87 CAMBRIDGE PARK DRIVE
CAMBRIDGE, MA 02140, US

72 Inventor/es:

CARTER, LAURA;
WHITTERS, MATTHEW, J.;
COLLINS, MARY;
YOUNG, DEBORAH, A.;
LARSEN, GLENN;
DONALDSON, DEBRA, D.;
LOWE, LESLIE, D.;
DUNUSSI, KYRI;
MA, MARGERY;
WITEK, JOANN, S.;
KASAIAN, MARION, T.;
UNGAR, MICHELLE y
CARRENO, BEATRIZ

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 629 395 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

Métodos y composiciones para modular la actividad de la interleucina-21

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos y composiciones para modular la actividad del receptor de interleucina-21 (IL-21)/IL-21 (MU-1) usando agonistas y antagonistas del receptor de IL-21. Los métodos y composiciones descritos en este documento son útiles como agentes inmunoterapéuticos.

Antecedentes de la invención

10 La IL-21 humana es citocina de aproximadamente 131 aminoácidos de longitud que muestra homología de secuencia con IL-2, IL-4 e IL-15 (Parrish-Novak et al. (2000) Nature 408:57-63). A pesar de la baja homología de secuencias entre las citocinas interleucinas, las citocinas comparten un pliegue común en una estructura de "haz de cuatro hélices" que es representativa de la familia. La mayoría de las citocinas se unen ya sea a los receptores de citocinas de clase I o clase II. Los receptores de citocinas de clase II incluyen los receptores de IL-10 y los interferones, mientras que los receptores de citocina de clase I incluyen los receptores de IL-2-IL7, IL-9, IL-11-13 e IL-15, así como factores de crecimiento hematopoyéticos, leptina y hormona de crecimiento (Cosman, D. (1993) Cytokine 5:95-106).

15 La IL-21R humana es un receptor de citocina de clase I que se expresa en tejidos linfoides, en particular por células NK, B y T (Parrish-Novak et al. (2000) supra). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos que codifican la interleucina-21 humana (IL-21) y su receptor (IL-21R) se describen en el documento WO 00/53761; WO 01/85792; Parrish-Novak et al. (2000) supra; Ozaki et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:11439-114444. IL-21R tiene la homología de secuencia más alta con la cadena β del receptor de IL-2 y la cadena α del receptor de IL-4 (Ozaki et al. (2000) supra). Al unirse el ligando, IL-21R se asocia con la cadena común de receptores de citocinas gamma (γ) que es compartida por receptores de IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13 e IL-15 (Ozaki et al. (2000) supra; Asao et al. (2001) J. Immunol. 167:1-5). La distribución linfocitaria generalizada de IL-21R sugiere que IL-21 puede desempeñar un papel en la regulación inmune. De hecho, los estudios *in vitro* han demostrado que la IL-21 modula significativamente la función de las células B, las células T CD4⁺ y CD8⁺ y las células NK (Parrish-Novak et al. (2000) supra; Kasaian, M.T. et al. (2002) Immunity. 16:559-569). No obstante, la evidencia que apoya un efecto regulador de IL-21 *in vivo* es limitada.

20 El documento WO0053761 se refiere al uso del ligando α 11 (esto es, IL-21) o antagonistas del ligando (esto es, antagonistas de IL-21) en el tratamiento de muchas enfermedades, por ejemplo, artritis (véanse las páginas. 65, 11. 14-26).

Resumen de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

35 Se describen métodos y composiciones para modular la actividad de, y/o una interacción entre, una interleucina-21 (IL-21) y un receptor de IL-21 (también denominado en este documento como "IL-21R" o "MU-1") utilizando agonistas o antagonistas de IL-21 o IL-21R (también denominados en este documento como un "agonista de IL-21/IL-21R" o "agonista", y "antagonista de IL-21/IL-21R" o "antagonista", respectivamente).

40 En una realización, los solicitantes han demostrado que la reducción de la actividad de IL-21R mediante el uso de un antagonista de IL-21, por ejemplo, una proteína de fusión que incluye el dominio extracelular de la IL-21R fusionada a una región de inmunoglobulina Fc, mejora los síntomas inflamatorios en modelos animales de artritis inducida por colágeno (CIA) (Ejemplo 7). La expresión del ARNm de IL-21R se aumenta en las patas de ratones con CIA (Ejemplo 8). De acuerdo con lo anterior, se pueden usar antagonistas de la actividad de IL-21/IL-21R para inducir supresión inmune *in vivo*, por ejemplo, para tratar o prevenir patologías asociadas con células inmunes (por ejemplo, patologías asociadas con actividad aberrante de una o más células T maduras (células T CD8⁺ maduras, CD4⁺ maduras), células NK maduras, células B, macrófagos y megacariocitos, incluyendo rechazo de trasplantes y trastornos autoinmunes, por ejemplo, artritis (incluyendo la artritis reumatoide).

45 De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la divulgación presenta un método de tratamiento (por ejemplo, cura, supresión, mejora, retraso o prevención de la aparición o prevención de la recurrencia o recaída de) o prevención de una enfermedad asociada con células inmunes, por ejemplo, artritis reumatoide, en un sujeto, el método incluye: administrar al sujeto un antagonista de IL-21/IL-21R, en una cantidad suficiente para inhibir o reducir la actividad de células inmunes y/o el número de células, tratando o previniendo así la enfermedad asociada con las células inmunes, por ejemplo, artritis reumatoide.

50 El antagonista de IL-21/IL-21R se puede administrar al sujeto, solo o en combinación, con otras modalidades terapéuticas como se describe en este documento. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un humano que sufre de una patología asociada a células inmunes (por ejemplo, una patología asociada con actividad aberrante de una o más células T maduras (células T CD8⁺ maduras, CD4⁺ maduras), células NK maduras, células

B, macrófagos y megacariocitos, incluyendo el rechazo de trasplantes y trastornos autoinmunes. Por ejemplo, el método se puede usar para tratar o prevenir, en un sujeto, trastornos asociados a células inmunes, por ejemplo, un trastorno elegido entre uno o más de: rechazo de trasplante o un trastorno autoinmune (por ejemplo, incluyendo, por ejemplo, diabetes mellitus (tipo I), artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriásica y espondilitis anquilosante), esclerosis múltiple, miastenia gravis, vasculitis, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmune, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eczematosa), psoriasis, esclerodermia, asma, alergia, IBD o enfermedad de Crohn). Se prefiere el tratamiento de un trastorno artrítico, por ejemplo, un trastorno elegido entre uno o más de la artritis reumatoide, la artritis reumatoide juvenil, la osteoartritis, la artritis psoriásica o la espondilitis anquilosante (preferiblemente la artritis reumatoide) usando los antagonistas de IL-21 o IL-21R descritos y/o reivindicados en este documento.

En una realización, el antagonista de IL-21/IL-21R interacciona con, por ejemplo, se une a IL-21 o IL-21R, preferiblemente a, por ejemplo, IL-21 o IL-21R humana, de mamífero, (denominado en este documento como un "antagonista de IL-21" y "antagonista de IL-21R", respectivamente), y reduce o inhibe una o más actividades de IL-21 y/o IL-21R. Los antagonistas preferidos se unen a IL-21 o IL-21R con alta afinidad, por ejemplo, con una constante de afinidad de al menos aproximadamente 10^7 M⁻¹, preferiblemente de aproximadamente 10^8 M⁻¹ y más preferiblemente de aproximadamente 10^9 M⁻¹ a 10^{10} M⁻¹ o más fuerte.

Por ejemplo, un antagonista de IL-21/IL-21R puede reducir y/o inhibir la actividad de IL-21R neutralizando IL-21. En una realización, el antagonista puede ser una proteína de fusión que incluye un fragmento de una IL-21R fusionado a un fragmento no IL21R, por ejemplo, una región Fc de inmunoglobulina. En otras realizaciones, el antagonista es un anticuerpo anti-IL21R o anti-IL21 o un fragmento de unión al antígeno del mismo, una forma soluble del receptor de IL-21, un péptido o un inhibidor de molécula pequeña.

En una realización, el antagonista de IL-21/IL-21R es un anticuerpo anti-IL21R o anti-IL21, o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Por ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o de especificidad única, que se une a IL-21, por ejemplo, IL-21 humana o un receptor de IL-21, por ejemplo, un polipéptido del receptor de IL-21 humana, o un fragmento de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, un Fab, F(ab')₂, Fv o un fragmento Fv de cadena sencilla). Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado, quimérico o generado *in vitro* para la IL-21 humana o el polipéptido del receptor de IL-21 humana. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo neutralizante.

En otras realizaciones, el antagonista de IL-21/IL-21R incluye la longitud total, o un fragmento de un polipéptido de IL-21, por ejemplo, un dominio de unión al receptor de IL-21 de un polipéptido de IL-21, por ejemplo, un polipéptido de IL-21 humana (por ejemplo, un polipéptido de IL-21 humana como se describe en este documento que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 19) o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma; o codificada por una secuencia de nucleótidos correspondiente mostrada como SEQ ID NO:18 o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma. Alternativamente, el antagonista incluye la longitud completa (por ejemplo, desde aproximadamente los aminoácidos 1-538 o 20-538 de SEQ ID NO: 2 o desde aproximadamente los aminoácidos 1-529 o 20-529 de SEQ ID NO:10), o un fragmento de un polipéptido del receptor de IL-21, por ejemplo, un dominio de unión a IL-21 de un polipéptido del receptor de IL-21, por ejemplo, un fragmento soluble de una IL-21R (por ejemplo, un fragmento de una IL-21R que comprende el dominio extracelular de la IL-21R murina o humana; por ejemplo, desde aproximadamente los aminoácidos 1-235, 1-236, 20-235, 20-236 de SEQ ID NO:2 (humana), o desde aproximadamente los aminoácidos 1-236,20-236 de SEQ ID NO:10 (murina), o codificada por los nucleótidos correspondientes de SEQ ID NO:1 o 9, o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma.

En una realización, el antagonista es una proteína de fusión que comprende los polipéptidos del receptor de IL-21 o IL-21 mencionados anteriormente o fragmentos de los mismos y, por ejemplo, fusionado con, una segunda unidad estructural, por ejemplo, un polipéptido (por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina, una secuencia de polipéptido GST, Lex-A o MBP). En una realización preferida, la proteína de fusión incluye al menos un fragmento de un polipéptido de IL-21R, que es capaz de unir IL-21, por ejemplo, un fragmento soluble de una IL-21R (por ejemplo, un fragmento de una IL-21R que comprende el dominio extracelular de la IL-21R murina o humana; por ejemplo, desde aproximadamente los aminoácidos ácidos 1-235, 1-236, 20-235, 20-236 de SEQ ID NO:2 (humana), o desde aproximadamente los aminoácidos 1-236, 20-236 de SEQ ID NO:10 (murina), o codificada por los nucleótidos correspondientes de SEQ ID NO:1 o 9, o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma) y, por ejemplo, fusionado a, una segunda unidad estructural, por ejemplo, un polipéptido (por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina, un fragmento Fc, unas regiones constantes de cadena pesada de los diversos isotipos, incluyendo: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, e IgE). Por ejemplo, la proteína de fusión puede incluir el dominio extracelular de IL-21R humana, por ejemplo, desde aproximadamente los aminoácidos 1-235, 1-236, 20-235, 20-236 de SEQ ID NO:2, y, por ejemplo, fusionado a, una cadena Fc de inmunoglobulina humana (por ejemplo, IgG humana, por ejemplo, IgG1 humana o una forma mutada de IgG1 humana). En una realización, la secuencia Fc humana ha sido mutada en uno o más aminoácidos, por ejemplo, mutada en los residuos 254 y 257 de SEQ ID NO:28, a partir de una secuencia de tipo salvaje para reducir la unión del receptor de Fc. En otras realizaciones, la proteína de fusión puede incluir el dominio extracelular de la IL-21R murina, por ejemplo, desde aproximadamente

los aminoácidos 1-236, 20-235 de SEQ ID NO:10 (murina), y, por ejemplo, fusionados a, una cadena Fc de inmunoglobulina murina (por ejemplo, IgG murina, por ejemplo, IgG2a murina o una forma mutada de IgG2a murina).

5 Las proteínas de fusión pueden incluir adicionalmente una secuencia enlazadora que une la primera unidad estructural, por ejemplo, un fragmento IL-21R, a la segunda unidad estructural, por ejemplo, el fragmento de inmunoglobulina. En otras realizaciones, se pueden adicionar secuencias de aminoácidos adicionales al extremo N o C de la proteína de fusión para facilitar la expresión, flexibilidad estérica, detección y/o aislamiento o purificación.

10 Ejemplos de proteínas de fusión antagónicas que se pueden usar en los métodos descritos se muestran en las figuras 7-15. En una realización, la proteína de fusión incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de, por ejemplo, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, o SEQ ID NO:39, o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma. En otras realizaciones, la proteína de fusión incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada de, por ejemplo, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, o SEQ ID NO:38, o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma. Las proteínas de fusión preferidas tienen la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:25 o SEQ ID NO:29 (Figuras 8A-8C y 10A-10C, respectivamente), o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma. En otras realizaciones, la proteína de fusión incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada de, por ejemplo, SEQ ID NO:24 o SEQ ID NO:28 (Figuras 8A-8C y 10A-10C, respectivamente), o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma. Más preferiblemente, la proteína de fusión tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:29, o tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:28 (Figura 10A-10C).

15 Los antagonistas de IL-21/IL-21R descritos en este documento, por ejemplo, la proteína de fusión descrita en este documento, se pueden derivar o unir a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab'). Por ejemplo, la proteína de fusión o un anticuerpo, o porción de unión al antígeno, puede estar funcionalmente unida (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más de otras entidades moleculares, tales como un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico), toxinas, radioisótopos, agentes citotóxicos o citostáticos, entre otros.

20 En una realización, los antagonistas de IL-21/IL-21R descritos en este documento, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de los mismos, se administran en terapia de combinación, esto es, combinados con otros agentes, por ejemplo, agentes terapéuticos, que son útiles para tratar trastornos patológicos asociados con células inmunes, por ejemplo, un trastorno seleccionado de uno o más de: artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriásica o espondilitis anquilosante), o esclerodermia, lupus eritematoso sistémico o vasculitis; preferiblemente, artritis reumatoide). Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir uno o más antagonistas de IL-21/IL-21R, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-21 o anti-IL-21R o un fragmento de unión al antígeno del mismo; una proteína de fusión de IL-21R; un receptor de IL-21R soluble; un inhibidor de péptido o un inhibidor de molécula pequeña) coformulados con, y/o coadministrados con, uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo uno o más citocinas e inhibidores del factor de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, inhibidores metabólicos, Inhibidores enzimáticos, y/o agentes citotóxicos o citostáticos, como se describe más adelante en este documento.

25 30 35 40 45 50 55 Ejemplos de agentes terapéuticos adicionales preferidos que pueden ser coadministrados y/o coformulados con uno o más antagonistas de IL-21/IL-21R, incluyen, pero no se limitan a, uno o más de: antagonistas de TNF (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, generados *in vitro* o humanos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a TNF; fragmentos solubles de un receptor de TNF, por ejemplo, receptor de TNF humano p55 o p75 o derivados del mismo, por ejemplo TNFR-IgG de 75 kd (proteína de fusión de IgG del receptor de TNF-proteína de 75 kd, Enbrel™), proteína de fusión del receptor de TNF de p55 kD, antagonistas de enzima de TNF, por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de TNF- α (TACE)); antagonistas de IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-22; agentes supresores de célula T y célula B (por ejemplo, anticuerpos anti-CD4 o anti-CD22); inhibidores de molécula pequeña, por ejemplo, metotrexato y leflunomida; sirolimus (rapamicina) y análogos de los mismos, por ejemplo, CCI-779; inhibidores de Cox-2 y cPLA2; NSAID; inhibidores de p38, inhibidores de TPL-2, Mk-2 y NF κ b; RAGE o RAGE soluble; inhibidores de P-selectina o PSGL-1 (por ejemplo, inhibidores de moléculas pequeñas, anticuerpos para los mismos, por ejemplo, anticuerpos contra P-selectina); agonistas de receptores de estrógeno beta (ERB) o antagonistas de ERB-NF κ b. Los agentes terapéuticos adicionales más preferidos que pueden ser coadministrados y/o coformulados con uno o más antagonistas de IL-21/IL-21R incluyen uno o más de: un fragmento soluble de un receptor de TNF, por ejemplo, receptor de TNF humano p55 o p75 o derivados del mismo, por ejemplo, TNFR-IgG de 75 kd (proteína de fusión del receptor de TNF de 75 kD, Enbrel™); metotrexato, leflunomida, o un sirolimus (rapamicina) o un análogo del mismo, por ejemplo, CCI-779.

60 Los solicitantes han mostrado además que un agonista de IL-21/IL-21R, por ejemplo, un polipéptido de IL-21, estimula la inmunidad *in vivo* contra células tumorales inmunogénicas y no inmunogénicas (Ejemplo 9). La inmunidad aumentada se debe en parte a la potenciación mediada por IL-21 de la función efectora de células T CD8⁺ maduras. Los agonistas de IL-21/IL-21R se pueden usar solos o en combinación con un antígeno, por ejemplo,

como un adyuvante (por ejemplo, un adyuvante de vacuna), para inducir la expresión de una respuesta inmune *in vivo*, por ejemplo, para uso en el tratamiento del cáncer o un trastorno infeccioso en un sujeto.

5 De acuerdo con lo anterior, la divulgación proporciona un método para tratar (por ejemplo, curar, suprimir, mejorar, retrasar o prevenir la aparición de, o prevenir la reaparición o recaída de) o prevenir un cáncer o un trastorno infeccioso, en un sujeto, el método incluye: administrar al sujeto un agonista de IL-21/IL-21R, por ejemplo, un agente que aumenta o potencia la actividad de IL-21/IL-21R, en una cantidad suficiente para aumentar la actividad de células inmunes (por ejemplo, células CD8⁺) (por ejemplo, actividad de células efectoras) y/o número de células, tratando o previniendo así dicho trastorno. Los trastornos de cáncer de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, un tumor sólido, un tumor de tejido blando (por ejemplo, un linfoma o una leucemia) y una lesión metastásica. Ejemplos de trastornos de infecciones que se pueden tratar o prevenir incluyen infecciones bacterianas, virales y parasitarias.

10 En una realización, un método para aumentar la capacidad de una composición de vacuna que contiene un antígeno, por ejemplo, un antígeno de un patógeno, por ejemplo, un patógeno bacteriano, viral y parasitario, o una célula tumoral, para provocar una respuesta inmune protectora en un sujeto contra el antígeno administrando al sujeto, ya sea de forma simultánea o secuencialmente, a la composición de vacuna, una cantidad de adyuvante eficaz de un agonista de IL-21/IL-21R (por ejemplo, un polipéptido de IL-21 o un fragmento biológicamente activo del mismo, o un ácido nucleico que codifica el mismo). En una realización, el patógeno contra el que se dirige la vacuna es un patógeno intracelular, por ejemplo, un virus, una bacteria o un protozoario. El patógeno también puede ser un parásito extracelular, por ejemplo, un helminto o una bacteria. El antígeno puede ser una célula entera, una proteína, una subunidad o fragmento de proteína.

15 Los agonistas de IL-21/IL-21R preferidos se unen a IL-21 o IL-21R con alta afinidad, por ejemplo, con una constante de afinidad de al menos aproximadamente 10^7 M^{-1} , preferiblemente aproximadamente 10^8 M^{-1} , y más preferiblemente, aproximadamente 10^9 M^{-1} a 10^{10} M^{-1} o más fuerte.

20 En una realización, el agonista de IL-21/IL-21R es un polipéptido de IL-21, por ejemplo, un polipéptido de IL-21 humana, o un fragmento activo del mismo (por ejemplo, un polipéptido de IL-21 humana que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:19, o codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:18, o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma). En otras realizaciones, el agonista de IL-21/IL-21R es una proteína de fusión que comprende un polipéptido de IL-21, por ejemplo, polipéptido de IL-21 humana, o un fragmento del mismo y, por ejemplo, fusionado a, una segunda unidad estructural, por ejemplo, un polipéptido (por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina, un fragmento Fc, unas regiones constantes de cadena pesada de los diversos isotipos, incluyendo: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, e IgE); un anticuerpo agonista o fragmento de unión al antígeno del mismo, al receptor de IL-21; o un agonista de péptido o de molécula pequeña. En otras realizaciones, el agonista de IL-21/IL-21R es un agente que aumenta la actividad o niveles de IL-21, por ejemplo, aumentando la expresión, procesamiento y/o secreción de IL-21 funcional. También se pueden administrar al sujeto ácidos nucleicos que codifican los agonistas y/o antígenos de IL-21/IL-21R mencionados anteriormente.

25 Los agonistas de IL-21/IL-21R descritos en este documento se pueden usar, solos o en combinación, con otras modalidades terapéuticas. Si se desea, el agonista de IL-21/IL-21R se puede administrar conjuntamente con uno o más agentes adicionales que aumentan una respuesta inmune, por ejemplo, un agente que mejora una respuesta inmune a un cáncer o enfermedad infecciosa, en el sujeto (por ejemplo, un péptido antigénico, solo o en combinación con una célula presentadora de antígeno, por ejemplo, una célula dendrítica). Por ejemplo, el(los) agonista(s) de IL-21/IL-21R se puede(n) administrar por sí mismos o en combinación con un antígeno, por ejemplo, como coadyuvante (por ejemplo, un adyuvante de vacuna) y/o en combinación con otras citocinas (por ejemplo, IL-2, GM-CSF y/o IL-15). La terapia de combinación se puede llevar a cabo en cualquier orden, por ejemplo, IL-15 y el antígeno puede ser coadministrado a un sujeto, seguido por estimulación de la respuesta inmune mediante la administración de IL-21 y el antígeno.

30 Preferiblemente, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un ser humano que sufre un cáncer o un trastorno infeccioso. El agonista de IL-21/IL-21R está diseñado preferiblemente para aumentar la respuesta inmune a un cáncer o enfermedad infecciosa. La enfermedad infecciosa puede ser causada por, por ejemplo, agentes bacterianos, parasitarios o virales.

35 En otro aspecto, la divulgación presenta un método para modular, por ejemplo, aumentar o disminuir, la actividad y/o el número de células inmunes (por ejemplo, la actividad y/o el número de una o más de: una célula T madura (células T CD8⁺, CD4⁺, madura), células NK maduras, células B, macrófagos o megacariocitos, preferiblemente, células T CD8⁺ maduras o macrófagos) o una población de células inmunes, por ejemplo, una población de células inmunes mixtas o sustancialmente purificadas. El método incluye poner en contacto una célula inmune, por ejemplo, una célula inmune tal como se describe en este documento, con un agonista o antagonista de IL-21/IL-21R, por ejemplo, un agonista o antagonista como se describe en este documento, en una cantidad suficiente para modular, por ejemplo, incrementar o disminuir, la actividad y/o el número de células inmunes.

El método en cuestión se puede usar en células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, las células inmunes, por ejemplo, células T, como se describen en este documento, se pueden cultivar *in vitro* en medio de

cultivo y la etapa de contacto se puede efectuar añadiendo uno o más agonista(s) o antagonista(s) de IL-21/IL-21R, por ejemplo, un agonista o antagonista como se describe en este documento, al medio de cultivo. Alternativamente, el método se puede realizar en células (por ejemplo, células inmunes como se describe en este documento) presentes en un sujeto, por ejemplo, como parte de un protocolo *in vivo* (por ejemplo, terapéutico o profiláctico).

5 La célula inmune puede ser seleccionada de, por ejemplo, una o más de: una célula T madura (célula T de CD8+, CD4+, ganglio linfático, de memoria, madura), célula NK madura, célula B, célula presentadora de antígeno (APC), por ejemplo, una célula dendrítica, un macrófago o un megacariocito, o una población de células, por ejemplo, una población de células inmunes mixta o sustancialmente purificada. Preferiblemente, la célula inmune es una célula T CD8+ madura o un macrófago.

10 Un cambio en la actividad de las células inmunes incluye cualquier variación(es), por ejemplo, aumento/disminución, en uno o más de: proliferación, secreción y/o producción de citocinas, supervivencia, diferenciación, capacidad de respuesta celular (por ejemplo, desensibilización), actividad citolítica, actividad de las células efectoras, expresión génica, entre otras, de la célula inmune contactada con un agonista o antagonista de IL-21/IL-21R comparada con una referencia, por ejemplo, una célula inmune no tratada. Por ejemplo, el contacto de una célula inmune con un
15 agonista de IL-21/IL-21R, por ejemplo, un polipéptido de IL-21, puede inducir uno o más de: proliferación, actividad citolítica, función de células efectoras o secreción de citocinas de uno o más de: timocitos estimulados con anticuerpo anti-CD3 o antígeno; células T de ganglios linfáticos, células T CD4+ maduras, células T CD8+ maduras, o macrófagos.

20 La capacidad de respuesta de células inmunes, por ejemplo, células T, a señales estimuladoras también se puede modular usando un agonista o antagonista como se describe en este documento. Por ejemplo, la proliferación de células T a aloantígenos se puede aumentar en presencia de un polipéptido de IL-21. La IL-21 también puede potenciar la proliferación y/o diferenciación de células T CD8+ maduras. Por ejemplo, el cebado de células T CD8+ en presencia de IL-21 puede generar células efectoras con actividad lítica aumentada (CTL) y/o capacidad
25 incrementada para secretar citocinas, por ejemplo, IFN γ . En otras realizaciones, el agonista de IL-21/IL-21R se puede usar para inducir la proliferación y/o secreción de citocinas de macrófagos.

En una realización, se proporciona un método para disminuir la actividad de células inmunes (por ejemplo, la actividad de una o más de: una célula T madura (célula T de ganglio linfático, CD8+, CD4+, célula T de memoria, madura), célula NK madura, célula B, célula de presentación de antígeno (APC), por ejemplo, una célula dendrítica,
30 macrófago o megacariocito, o una población de células, por ejemplo, una población de células inmunes mixtas o sustancialmente purificadas. El método incluye poner en contacto la célula inmune con un antagonista de IL-21/IL-21R, por ejemplo, un antagonista como se describe en este documento, en una cantidad suficiente para disminuir la actividad de la célula inmune.

En otras realizaciones, se proporciona un método para aumentar la actividad y/o número de células inmunes (por ejemplo, la actividad y/o el número de una o más de: una célula T madura (célula T de ganglio linfático, CD8+,
35 CD4+, célula T de memoria, madura), célula NK madura, célula B, célula presentadora de antígeno (APC), por ejemplo, una célula dendrítica, macrófago o megacariocito, o una población de células, por ejemplo, una población de células mixtas o inmunes sustancialmente purificada. El método incluye poner en contacto una célula inmune con un agonista de IL-21/IL-21R, por ejemplo, un agonista como se describe en este documento, en una cantidad suficiente para aumentar la actividad de la célula inmune.

40 En otro aspecto, la divulgación presenta una proteína de fusión que incluye al menos un fragmento de un polipéptido de IL-21R, que es capaz de unirse a un polipéptido de IL-21, por ejemplo, un fragmento soluble de una IL-21R (por ejemplo, un fragmento de una IL-21R que comprende el dominio extracelular de IL-21R murina o humana; por ejemplo, desde aproximadamente los aminoácidos 1-235, 1-236, 20-235, 20-236 de SEQ ID NO:2 (humana), o desde aproximadamente los aminoácidos 1-236, 20-236 de SEQ ID NO:10 (murina), o codificada por los nucleótidos correspondientes de SEQ ID NO:1 o 9, o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma)
45 y, por ejemplo, fusionado a, una segunda unidad estructural, por ejemplo, un polipéptido (por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina, un fragmento Fc, unas regiones constantes de cadena pesada de los diversos isotipos, incluyendo: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, e IgE). Por ejemplo, la proteína de fusión puede incluir el dominio extracelular de IL-21R humana, por ejemplo, desde aproximadamente los aminoácidos 1-235, 1-236, 20-235, 20-236 de SEQ ID NO:2, y, por ejemplo, fusionado a, una cadena Fc de inmunoglobulina humana (por ejemplo, IgG humana, por ejemplo, IgG1 humana o una forma mutada de IgG1 humana). En una realización, la secuencia Fc humana ha sido mutada en uno o más aminoácidos, por ejemplo, mutada en los residuos 254 y 257 de SEQ ID NO:28, a partir de una secuencia de tipo salvaje para reducir la unión del receptor de Fc. En otras realizaciones, la
50 proteína de fusión puede incluir el dominio extracelular de la IL-21R murina, por ejemplo, desde aproximadamente los aminoácidos 1-236, 20-236 de SEQ ID NO:10 (murina), y, por ejemplo, fusionado a, una cadena Fc de inmunoglobulina murina (por ejemplo, IgG murina, por ejemplo, IgG2a murina o una forma mutada de IgG2a murina). Las proteínas de fusión pueden incluir adicionalmente una secuencia enlazadora que une el fragmento de IL-21R a la segunda unidad estructural. En otras realizaciones, secuencias de aminoácidos adicionales se pueden adicionar al extremo N o C de la proteína de fusión para facilitar la expresión, detección y/o aislamiento o purificación.

La proteína de fusión descrita en este documento se puede derivar o unir a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab'). Por ejemplo, la proteína de fusión puede estar funcionalmente unida (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más otras entidades moleculares, tales como un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico), toxinas, radioisótopos, agentes citotóxicos o citostáticos, entre otros.

Ejemplos de proteínas de fusión antagonicas que se pueden usar en los métodos descritos se muestran en las figuras 7-15. En una realización, la proteína de fusión incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de, por ejemplo, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, o SEQ ID NO:39, o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma. En otras realizaciones, la proteína de fusión incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada de, por ejemplo, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, o SEQ ID NO:38, o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma. Las proteínas de fusión preferidas tienen la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:25 o SEQ ID NO:29 (Figuras 8A-8C y 10A-10C, respectivamente), o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma. En otras realizaciones, la proteína de fusión incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada de, por ejemplo, SEQ ID NO:24 o SEQ ID NO:28 (Figuras 8A-8C y 10A-10C, respectivamente), o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma. Más preferiblemente, la proteína de fusión tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:29, o tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:28 (Figura 10A-10C).

La divulgación también presenta secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión descritas en este documento.

En otro aspecto, la divulgación presenta células huésped y vectores que contienen los ácidos nucleicos descritos. Preferiblemente, la célula huésped es una célula eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula de levadura, o una célula procariótica, por ejemplo *E. coli*. Por ejemplo, la célula de mamífero puede ser una célula cultivada o una línea celular. Ejemplos de células de mamífero incluyen líneas celulares linfocíticas (por ejemplo, NSO), células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, células de ovocitos y células de un animal transgénico, por ejemplo, células epiteliales mamarias. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión descritas en este documento se pueden expresar en un animal transgénico. En una realización, los ácidos nucleicos se colocan bajo el control de un promotor específico de tejido (por ejemplo, un promotor específico de mamífero) y el anticuerpo se produce en el animal transgénico. Por ejemplo, la proteína de fusión se secreta en la leche del animal transgénico, tal como una vaca transgénica, cerdo, caballo, oveja, cabra o roedor.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para producir una proteína de fusión, por ejemplo, una proteína de fusión como se describe en este documento. El procedimiento comprende: (a) cultivar un cultivo de la célula huésped de la presente invención en un medio de cultivo apropiado; y (b) purificar la proteína de fusión del cultivo. También se proporcionan las proteínas producidas de acuerdo con estos métodos.

En otro aspecto, se describen y/o se reivindican en este documento composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, que incluyen un portador farmacéuticamente aceptable y al menos uno de entre el agonista o un antagonista de IL-21/IL-21R como se describe en este documento (por ejemplo, una proteína de fusión descrita en este documento). En una realización, las composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, comprenden una combinación de dos o más de uno de los agonistas o antagonistas de IL-21/IL-21R anteriormente mencionados. Las combinaciones de los agonistas o antagonistas de IL-21/IL-21R y un fármaco, por ejemplo, un agente terapéutico (por ejemplo, uno o más inhibidores del factor de crecimiento y citocina, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, inhibidores metabólicos, inhibidores enzimáticos y/o agentes citotóxicos o citostáticos, como se describe además en este documento) o un antígeno, por ejemplo, un péptido antigénico y/o una célula presentadora de antígeno, también se describen y/o se reivindican en este documento.

En una realización, la composición farmacéutica incluye un agonista o antagonista de IL-21/IL-21R y al menos un agente terapéutico adicional, en un portador farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de agentes terapéuticos adicionales preferidos que pueden ser coformulados en una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, con uno o más antagonistas de IL-21/IL-21R, incluyen, pero no se limitan a, uno o más de: antagonistas de TNF (Por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o generados *in vitro*, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a TNF; fragmentos solubles de un receptor de TNF, por ejemplo, receptor de TNF humano p55 o p75 o derivados del mismo, por ejemplo, TNFR-IgG de 75 kd (proteína de fusión del receptor de TNF de 75 kD, Enbrel™), proteína de fusión del receptor de TNF de p55 kD; antagonistas de enzima de TNF, por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de TNF α); antagonistas de IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-22; agentes supresores de célula T y célula B (por ejemplo, anticuerpos anti-CD4 o anti-CD22); inhibidores de molécula pequeña, por ejemplo, metotrexato y leflunomida; sirolimus (rapamicina) y análogos del mismo, por ejemplo, inhibidores de CCI-779; Cox-2 y cPLA2; NSAIDs; inhibidores de p38, inhibidores de TPL-2, Mk-2 y NF κ b; RAGE o RAGE soluble; inhibidores de P-selectina o PSGL-1 (por ejemplo, inhibidores de molécula pequeña,

anticuerpos a los mismos, por ejemplo, anticuerpos contra P-selectina); agonistas de receptores de estrógeno beta (ERB) o antagonistas de ERB-NFkb. Los agentes terapéuticos adicionales más preferidos que pueden ser coadministrados y/o coformulados con uno o más antagonistas de IL-21/IL-21R incluyen uno o más de: un fragmento soluble de un receptor de TNF, por ejemplo, receptor de TNF humano p55 o p75 o derivados del mismo, por ejemplo, TNFR-IgG de 75 kd (proteína de fusión del receptor de TNF de 75 kd, Enbrel™); metotrexato, leflunomida, o un sirolimus (rapamicina) o un análogo del mismo, por ejemplo, CCI-779.

En otra realización, se proporciona una composición farmacéutica útil como una vacuna que comprende un antígeno de un microorganismo patógeno, por ejemplo, un microorganismo viral, bacteriano o parasitario, y una cantidad eficaz de un agonista de IL-21/IL-21R, en un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición resultante es capaz de provocar la inmunidad del sujeto vacunado para una respuesta protectora al patógeno. El agonista de IL-21/IL-21R y antígeno utilizado en la composición puede ser un polipéptido o fragmento biológicamente activo del mismo, o en una composición que comprende ácidos nucleicos que codifican el mismo. Estos ácidos nucleicos, junto con las secuencias promotoras apropiadas, se pueden emplear directamente como un antígeno administrado con, o cerca del tiempo, al adyuvante agonista de IL-21/IL-21R. Alternativamente, estas secuencias de ácidos nucleicos pueden ser transducidas en cepas de vacuna alternativas del microorganismo patógeno, y tras la expresión *in vivo* pueden proporcionar el antígeno de la vacuna.

En otras realizaciones, la divulgación proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, para el tratamiento o mejora de un cáncer, y un método de adyuvante de una "vacuna" contra el cáncer, en un portador farmacéuticamente aceptable. Una vacuna contra el cáncer puede comprender un antígeno expresado en la superficie de un cáncer o una célula tumoral. Este antígeno puede estar naturalmente presente en la célula cancerígena. Alternativamente, la célula cancerígena puede manipularse *ex vivo* y transfectarse con un antígeno seleccionado, que luego expresa cuando se introduce en el paciente. Una composición farmacéutica de ejemplo descrita en este documento puede contener un antígeno de cáncer o de una célula tumoral (ya sea solo como proteína, fragmento biológicamente activo de la misma o ácido nucleico que la codifica), o una célula, por ejemplo una célula cancerígena transfectada con el antígeno de células tumorales o del cáncer, en combinación con un agonista de IL-21/IL-21R (por ejemplo, un agonista como se describe en este documento, un fragmento del mismo o un ácido nucleico que codifica el mismo). En una realización, la coadministración del agonista de JL-21/IL-21R con el antígeno de células tumorales mejora la actividad de células efectoras de células T CD8+ del antígeno de células tumorales.

Los métodos para producir las composiciones antes mencionadas, por ejemplo, composiciones de vacunas, también están abarcados por la presente divulgación

Los siguientes términos se usan indistintamente en este documento: "MU-1" e "IL-21R", y péptidos, polipéptidos y proteínas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende por un experto en el arte al que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento en la práctica o prueba de la invención, se describen a continuación métodos y materiales apropiados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A representa la secuencia de ADNc de longitud completa de IL-21R/MU-1 murina. La secuencia de nucleótidos corresponde a los nucleótidos 1-2628 de SEQ ID NO: 9.

Las figuras 2A-2B representan las secuencias de aminoácidos de IL-21R/MU-1 murina y humana. La figura 2A representa la secuencia de aminoácidos de IL-21R/MU-1 murina (correspondiente a los aminoácidos 1-529 de SEQ ID NO:10). Existe una secuencia líder pronosticada en los aminoácidos 1-19, que fue pronosticada por Susan con una puntuación de 10.1 (tipo negrita). Existe un dominio transmembrana pronosticado en los aminoácidos 237-253 de SEQ ID NO:10 (subrayado). Los motivos de señalización pronosticados incluyen las siguientes regiones: Caja 1: aminoácidos 265-274 y Caja 2: aminoácidos 310-324 (en negrita y subrayado); Seis tirosinas están situadas en las posiciones de aminoácidos 281, 319, 361, 368, 397 y 510 de SEQ ID NO:10. El motivo WSXWS (SEQ ID NO: 8) se localiza en el residuo de aminoácido 214 en el residuo de aminoácido 218 (en el tipo grande, en negrita). Los sitios potenciales de acoplamiento STAT incluyen los aminoácidos 393-398 y los aminoácidos 510-513 de SEQ ID NO:10.

La figura 2B representa la secuencia de aminoácidos de MU-1 humana (correspondiente a SEQ ID NO:2). La localización de la secuencia señal pronosticada (aproximadamente los aminoácidos 1-19 de SEQ ID NO:2); motivo WSXWS (aproximadamente los aminoácidos 213-217 de SEQ ID NO:2); y dominio transmembrana (aproximadamente los aminoácidos 236-252, 236-253, 236-254, de SEQ ID NO:2 (subrayado)). También se indican

sitios de unión JAK potenciales, motivos de señalización y sitios de acoplamiento STAT. La ubicación aproximada de estos sitios está en caja.

5 La figura 3 representa la comparación GAP de secuencias de ADNc de MU-1 humanas y murinas (correspondientes a los ácidos nucleicos 1-2665 de SEQ ID NO:1 y ácidos nucleicos 1-2628 de SEQ ID NO:9, respectivamente). HuMU-1 = MU-1 humana, murMU-1 = MU-1 murina. Parámetros de brecha: Peso de brecha = 50, Apareamiento promedio = 10.000, Peso de longitud = 3, Apareamiento erróneo promedio = 0.000. Identidad porcentual = 66.116.

10 La figura 4 representa una comparación GAP de la proteína MU-1 humana (correspondiente a los aminoácidos 538 de SEQ ID NO: 2) y la proteína MU-1 murina (correspondiente a los aminoácidos 1-529 de SEQ ID NO:10). Matriz de sustitución de aminoácidos BLOSUM62. (Henikoff, S. and Henikoff, J. G. (1992)). Matrices de sustitución de aminoácidos a partir de bloques de proteínas (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919). Parámetros de brecha = Peso de brecha: 8, Apareamiento promedio = 2,9 12, Peso de longitud = 2, Apareamiento erróneo promedio = - 2.003. Identidad porcentual = 65.267.

15 La figura 5 representa una alineación de secuencias múltiples de los aminoácidos de MU-1 humana (correspondiente a SEQ ID NO: 2), MU-1 murina (correspondiente a SEQ ID NO:10) y cadena de IL2beta humana (No. de acceso GENbank M26062). Los dominios líder y transmembrana están subrayados. Los motivos del módulo de receptor de citocinas conservadas están indicados por el tipo de negrita. Las posibles regiones de señalización se indican mediante subrayado y tipo de negrita.

20 La figura 6 representa la señalización a través de MU-1. MU-1 fosforila STAT 5 en clones E7 EPO-MU-1 quimera. En las condiciones especificadas en el ejemplo 3, la señalización a través de MU-1 dio como resultado la fosforilación de STAT 5 en todos los puntos temporales probados. El tratamiento de los controles o de las células BAF-3 quiméricas con IL-3 dio como resultado la fosforilación de STAT 3, pero no STAT 1 o 5.

25 Las figuras 7A-7B representan una alineación de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del monómero de IL-21R humana (correspondiente a los aminoácidos 20-235 de SEQ ID NO: 2) fusionada en el terminal amino a la secuencia líder de abeja melífera y etiquetas His6 (aminoácidos 1-44 de SEQ ID NO:23). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se muestran como SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:23, respectivamente.

30 Las figuras 8A-8C representan una alineación de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del dominio extracelular de IL-21R humana (correspondiente a los aminoácidos 1-235 de SEQ ID NO: 2) fusionada en el extremo C a través de un enlazador (correspondiente a los aminoácidos 236-243 de SEQ ID NO: 25) a la secuencia Fc de G1 de inmunoglobulina (IgG1) humana (correspondiente a los aminoácidos 244-467 de SEQ ID NO: 25). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se muestran como SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25, respectivamente.

35 Las figuras 9A-9C representan una alineación de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del dominio extracelular de IL-21R humana (correspondiente a los aminoácidos 1-235 de SEQ ID NO: 2) fusionada en el extremo C a través de un enlazador (correspondiente a los aminoácidos 236-243 de SEQ ID NO:27) a la secuencia Fc de G1 de la inmunoglobulina (IgG1) humana (correspondiente a los aminoácidos 244-467 de SEQ ID NO:27), y etiqueta de secuencia His6 (correspondiente a los aminoácidos 468-492 de SEQ ID NO:27). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se muestran como SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:27, respectivamente.

40 Las figuras 10A-10C representan una alineación de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del dominio extracelular de IL-21R humana (correspondiente a los aminoácidos 1-235 de SEQ ID NO: 2) fusionada en el extremo C a través de un enlazador (correspondiente a los aminoácidos 236-243 de SEQ ID NO:29) a la secuencia Fc de G1 de la inmunoglobulina (IgG1) humana (correspondiente a los aminoácidos 244-467 de SEQ ID NO:29) a la secuencia mutada de Fc de G1 de la inmunoglobulina (IgG1) humana. La secuencia de Fc humana ha sido mutada en los residuos 254 y 257 a partir de una secuencia de tipo salvaje para reducir la unión del receptor de Fc. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se muestran como SEQ ID NO:28 y SEQ ID NO:29, respectivamente.

45 Las figuras 11A-11B representan una alineación de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del dominio extracelular de IL-21R humana (correspondiente a los aminoácidos 1-235 de SEQ ID NO:2) fusionada en el extremo C a una etiqueta de secuencia de rodopsina. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se muestran como SEQ ID NO:30 y SEQ ID NO:31, respectivamente.

50 Las figuras 12A-12C representan una alineación de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del dominio extracelular de IL-21R humana (correspondiente a los aminoácidos 1-235 de SEQ ID NO: 2) fusionada en el extremo C a un sitio de escisión de EK y región de Fc IgG1 mutada (correspondiente a los aminoácidos 236-470 de SEQ ID NO:33). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se muestran como SEQ ID NO:32 y SEQ ID NO:33, respectivamente.

55 Las figuras 13A-13B representan una alineación de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del dominio extracelular de IL-21R murina fusionado en el extremo C a inmunoglobulina G2a (IgG2a) de ratón. Las secuencias de nucleótidos (genómicas) y de aminoácidos se muestran como SEQ ID NO:34 y SEQ ID NO:35, respectivamente.

- Las figuras 14A-14B representan una alineación de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del dominio extracelular de IL-21R murina fusionadas en el extremo C-terminal con las etiquetas de secuencias Flag y His6. Las secuencias de nucleótidos (genómicas) y de aminoácidos se muestran como SEQ ID NO:36 y SEQ ID NO:37, respectivamente.
- 5 Las figuras 15A-15B representan una alineación de las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del dominio extracelular de IL-21R murina (líder de abejas melíferas) fusionadas en el extremo C con las etiquetas de secuencias Flag y His6. Las secuencias de nucleótidos (genómicas) y de aminoácidos se muestran como SEQ ID NO:38 y SEQ ID NO:39, respectivamente.
- 10 La figura 16 es un cronograma que resume los programas de tratamiento profiláctico, terapéutico y semi-terapéutico para los experimentos usando modelos de ratón de artritis inducida por colágeno (CIA).
- La figura 17 es un gráfico que representa los efectos de mull21RFc (200 µg/ratón 3x/semana) sobre un ratón con CIA semi terapéutico en función de los días posteriores al tratamiento. Se usó Ig de ratón (200 µg/ratón 3x/semana) como control.
- 15 La figura 18 es un gráfico que representa los efectos de la IL-21 murina en la puntuación media de CIA en función de los días posteriores al refuerzo del colágeno. A los ratones se les inyectó 1 µg de IL21 murina por vía intraperitoneal al presentar una puntuación total del cuerpo de 2-4.
- La figura 19, paneles A-B, son fotografías que muestran una mayor expresión del ARNm de IL-21R en patas artríticas de ratones con CIA (panel A) en comparación con controles negativos (panel B).
- 20 Las figuras 20A-20C son gráficos de barras que representan el nivel y la actividad biológica de IL-21 secretada por células B16F1 y MethA transducidas con IL-21. La figura 20A muestra el nivel de secreción de IL-21 por células tumorales transducidas. La figura 20 (B, C) son gráficos de barras que representan la actividad biológica de IL-21 secretada por células tumorales transducidas. Los esplenocitos naïve de ratones ya sea C57BL/6 (B) o Balb/C (C) se estimularon durante 72 horas con las concentraciones indicadas de células tumorales singénicas irradiadas. Los cultivos se suplementaron con una cantidad subóptima de mAb anti-CD3 y anti-CD28 en placas de 96 pozos. Se
- 25 adicionó ³H timidina, durante las últimas 6 horas de cultivo.
- Las figuras 21A-21C son gráficos que representan las características de crecimiento *in vitro* de las células tumorales transducidas y la evaluación de la expresión de IL-21R. Las figuras 21A y 21B representan el número de células tumorales B16F1-IL-21 y B16F1-GFP o MethA-IL-21 y MethA-GFP, respectivamente, con respecto al tiempo en cultivo. La figura 21C es un gráfico de barras que representa la expresión de ARNm de IL-21R en las células transfectadas, se normalizó a los valores de ciclofilina y se expresó como una unidad relativa (R.U.).
- 30 Las figuras 22A-22B son gráficos lineales que representan las características de crecimiento *in vivo* de las células tumorales transducidas. Se inyectaron células tumorales que expresan IL-21 o GFP en ratones naïve singénicos como se indica. El tamaño del tumor se puntuó multiplicando diámetros perpendiculares y se promedió para todos los ratones en cada grupo. (A) Crecimiento tumoral en ratones C57BL/6 que se inyectaron con 10⁵ de células B16F1-IL-21 o GFP. (B) Crecimiento tumoral en ratones Balb/C que se inyectaron con ya sea 1x10⁶ o 2x10⁶ de células MethA-IL-21 o MethA-GFP.
- 35 Las figuras 23A-23B son gráficos lineales que representan los cambios en el crecimiento tumoral de B16F1-IL-21 en ratones scid y desnudos con respecto al número de días después de la inyección de células B16F1-IL-21. Se inyectaron células tumorales B16F1-IL-21 y B16F1-GFP (10⁵/ratón) en ratones C57BL/6 scid (A) o C57BL/6 desnudos (B). El tamaño del tumor se monitorizó dos veces por semana.
- 40 Las figuras 24A-24B son gráficos lineales que representan el crecimiento de células B16F1-IL-21 *in vivo* en ratones suprimidos de células T CD4+, CD8+ o NK. A) C57BL/6 se suprimieron de células T CD4+ o CD8+ mediante tres inyecciones consecutivas de mAb anti-CD4 o anti-CD8 en los días -3,-2 y -1 antes de la inyección de células tumorales y cada dos días después de B16F1-IL-21 y la inyección de células tumorales B16F1-GFP. (Se usó IgG de rata como control de isotipo). B) C57BL/6 se suprimieron de células NK mediante una inyección de GM1 Ab anti-asialo el día -1 antes de la inyección de células tumorales y dos veces por semana después de la inyección de células 10⁵ B16F1-IL-21 y B16F1-GFP. (se utilizaron IgG de rata o IgG de conejo como controles de isotipo para la depleción de células T y NK, respectivamente). El tamaño del tumor se monitorizó dos veces por semana como se describe en la figura 23.
- 45 Las figuras 25A-25C son gráficos que muestran respuestas de células T específicas de TRP-2 en ratones inyectados con B16F1-IL-21. (A) Se estimularon números iguales de esplenocitos (2-4 x 10⁵) de ratones inyectados con ya sea B16F1-IL-21 o B16F1-GFP con 5 µg/ml de péptido de TRP-2 en presencia de 20 U de IL-2 en una placa ELISPOT prerrecubierta con anti-IFNγ Ab. Después de 24 horas, se desarrolló la placa y se contaron unidades de formación de manchas. Los resultados se expresan como el número de unidades formadoras de manchas/millones de esplenocitos (SPU/millones de esplenocitos). (B) Actividad citolítica de esplenocitos de ratones inyectados B16F1-IL-
- 50
- 55

21 o (C) B16F1-GFP control se probaron contra células RMA-S pulsadas con TRP-2 o péptido OVA (control). La actividad citolítica se midió por ensayo estándar de liberación de Cr⁵¹ de 4 h.

Las figuras 26A-26B son gráficos lineales que representan el crecimiento *in vivo* de células B16F1-IL-21 en ratones IFN γ ^{-/-} y EL-10^{-/-}. (A) Se inyectaron ratones con IFN γ ^{-/-} o (B) ratones EL-10^{-/-} con 10⁵ de las células tumorales ya sea B16F1-IL-21 o B16F1-GFP y se monitorizó el crecimiento del tumor dos veces por semana.

Las figuras 27A-27B son gráficos de barras que representan la expresión de IL-21R e IL-21 por células T CD8+ naïve. Las células T CD8+/CD62L+ se clasificaron a partir de LN de ratones 2C TCR Tg y se estimularon con anti-CD3 (2.5 ug/ml de unido a la placa), IL-21 (12.5 ng/ml) o anti-CD28 (7.5 ug/ml unido a la placa). En los momentos indicados, las células se cosecharon, se preparó ARN y se realizó el análisis de RPA. Las muestras se cuantificaron mediante análisis de fosfoimágenes con respecto a un control interno. (A) Cuantificación de píxeles RPA para bandas IL-21R. (B) Cuantificación de píxeles RPA para bandas IL-21.

Las figuras 28A-28D son gráficos lineales que representan los efectos de IL-21 sobre la proliferación de células T CD8+. (A) IL-21 aumenta la estimulación antigénica de células T CD8+. Las células T CD8+ 2C purificadas se estimularon durante 72 horas con esplenocitos Balb/c irradiados a una proporción APC: T de 5:1 con la cantidad indicada de IL-21 o dilución equivalente de sobrenadante transfectado simulado (experimento representativo, n=5). (B) Efecto de IL-21 frente a IL-2, IL-12, IL-15 sobre la estimulación de antígenos. Células T 2C fueron estimuladas con proporción 3:1 T-suprimida APC:T y la concentración indicada de citocinas (n=3). (C) IL-21 actúa directamente sobre células T CD8+ para mejorar específicamente la proliferación. Las células T CD8+ 2C se estimularon en placas recubiertas con anti-CD3 (2.5ug/ml) con el título indicado de IL-21 +/- mL-21R.Fc (20ug/ml) (n=3). (D) Efecto de IL-21 frente IL-2, IL-12, IL-15 sobre la estimulación con mAb anti-CD3 (5ug/ml unido a la placa).

Las figuras 29A-29C son gráficos que muestran los efectos de IL-21 sobre el desarrollo de las funciones efectoras de células T CD8+. (A) IL-21 mejora la generación de CTL. Se estimularon células T 2C con APC irradiadas (APC:T) e IL-2 (10 U/ml), IL-21 (título) o la dilución equivalente de sobrenadante simulado durante 4 días, luego se lavaron, se contaron y se establecieron en un ensayo CTL de 4 h, usando P815 marcado con 51-Cr como dianas específicas (experimento representativo, n=3). (B) IL-21 es comparable a IL-12, IL-15 para inducir actividad lítica a partir de células T CD8+. Se estimularon las células T CD8+ 2C y se ensayó la actividad de CTL como en (A) usando IL-2 (5 ng/ml), IL-15 (50 ng/ml), IL-12 (5 ng/ml), IL-21 (25 ng/ml). (C) IL-21 durante el cebado dio como resultado una mayor capacidad para producir IFN γ . Las células T 2C se estimularon como se indica en (B) durante 5 días, luego se lavaron y se volvieron a estimular para placas recubiertas con anti-CD3 (1 ug/ml). Los ELISA de IFN γ se realizaron en sobrenadantes de 40 horas.

Descripción detallada de la invención

Se describen, los métodos y composiciones para la modulación de la actividad del receptor de interleucina-21 (IL-21)/IL-21 (MU-1) utilizando agonistas o antagonistas de IL-21 o del receptor de IL-21 ("IL-21R" o "MU-1"). Los antagonistas de IL-21/IL-21R se pueden usar para inducir supresión inmune *in vivo*, por ejemplo, para tratar o prevenir patologías asociadas con células inmunes (por ejemplo, patologías asociadas con actividad aberrante de una o más células T maduras (células T CD8+ maduras, CD4+ maduras), células NK maduras, células B, macrófagos y megacariocitos, incluyendo rechazo de trasplantes y trastornos autoinmunes). Los agonistas de IL-21/IL-21R se pueden usar solos o en combinación con un antígeno, por ejemplo, como un adyuvante (por ejemplo, un adyuvante de vacuna), para inducir la expresión de una respuesta inmune *in vivo*, por ejemplo, para uso en el tratamiento del cáncer y de los trastornos infecciosos.

En una realización, los solicitantes han demostrado que una reducción de la actividad de IL-21R usando una proteína de fusión neutralizante que incluye el dominio extracelular de la IL-21R fusionada a una región de inmunoglobulina Fc mejora los síntomas inflamatorios en modelos animales de artritis inducida con colágeno (CIA) en ratón (Ejemplo 7). La expresión del ARNm de IL-21R se aumenta en las patas de ratones con CIA (Ejemplo 8). De acuerdo con lo anterior, se pueden usar agentes de unión a IL-21R que antagonizan la actividad de IL-21/IL-21R para inducir supresión inmune *in vivo*, por ejemplo, para tratar o prevenir patologías asociadas con células inmunes (por ejemplo, patologías asociadas con actividad aberrante de uno o más de células T (células T CD8+, CD4+), células NK, células B, macrófagos y megacariocitos, incluyendo rechazo de trasplantes y trastornos autoinmunes).

En otras realizaciones, los solicitantes han demostrado que el agente de unión a IL-21R agonista estimula, principalmente a través de la estimulación de células T CD8+, inmunidad innata y adaptativa *in vivo* contra células tumorales inmunogénicas y no inmunogénicas (Ejemplo 9). De acuerdo con lo anterior, los agentes de unión que estimulan la vía de IL-21/IL-21R se pueden usar solos o en combinación con un antígeno, por ejemplo, como un adyuvante (por ejemplo, un coadyuvante de vacuna), para inducir la expresión de una respuesta inmune *in vivo*, por ejemplo, para uso en el tratamiento de cáncer y trastornos infecciosos.

Con el fin de que la presente invención se pueda entender más fácilmente, se definen en primer lugar ciertos términos. Definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

El término "MU-1", "proteína MU-1", "receptor de interleucina-21" o "IL-21R", como se usa en este documento, se refiere a un receptor de la familia de citocinas clase I, también conocido como NILR (WO 01/85792; Parrish-Novak et al. (2000) *Nature* 408:57-63; Ozaki et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:11439-114444). MU-1 es homóloga a la cadena β compartida de los receptores de IL-2 e IL-15, e IL-4 α (Ozaki et al. (2000) *supra*). Tras la unión del ligando, IL-21R/MU-1 es capaz de interactuar con una cadena común de receptores de citocinas γ (γ C) (Asao et al. (2001) *J. Immunol.* 167:1-5), e inducir la fosforilación de STAT1 y STAT3 (Asao et al. (2001) o STAT5 (Ozaki et al. (2000)). MU-1 muestra distribución de tejido linfóide generalizado. El término "MU-1" se refiere a un receptor (preferiblemente de mamífero, por ejemplo, origen murino o humano) que es capaz de interactuar con, por ejemplo, la unión a IL-21 (preferiblemente de IL-21 de mamífero, por ejemplo, murina o humana) y que tiene una de las siguientes características: (i) una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-21R/MU-1 de MU-1 de mamífero de origen natural o un fragmento de la misma, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 2 (humana) o SEQ ID NO:10 (murina) o un fragmento de la misma; (ii) una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a, por ejemplo, al menos 85%, 90%, 95%, 98%, 99% homóloga a, una secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 2 (humana) o SEQ ID NO: 10 (murina) o un fragmento de la misma; (iii) una secuencia de aminoácidos que está codificada por una secuencia de nucleótidos IL-21R/MU-1 de mamífero de origen natural o un fragmento de la misma (por ejemplo, SEQ ID NO:1 (humana) o SEQ ID NO:9 (murina) o un fragmento de la misma); (iv) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente homóloga a, por ejemplo, al menos 85%, 90%, 95%, 98%, 99% homóloga a, una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1 (humana) o SEQ ID NO:9 (murina) o un fragmento de la misma; (v) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos degenera a una secuencia de nucleótidos de IL-21R/MU-1 de origen natural o un fragmento de la misma, por ejemplo, SEQ ID NO:1 (humana) o SEQ ID NO:9 (murina) o un fragmento de la misma; o (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una de las secuencias de secuencia de nucleótidos anteriores en condiciones estrictas, por ejemplo, condiciones altamente estrictas.

La IL-21R/MU-1 es de origen mamífero, preferiblemente, humano. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos pronosticada de IL-21R/MU-1 humana se muestran en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente. El análisis de la secuencia de aminoácidos de la IL-21R/MU-1 humana (SEQ ID NO: 2, Figura 2B) reveló las siguientes características estructurales: una secuencia líder desde aproximadamente (aproximadamente los aminoácidos 1-19 de SEQ ID NO: 2 (Figura 2B)); motivo WSXWS (aproximadamente los aminoácidos 213-217 de SEQ ID NO: 2); dominio transmembrana (aproximadamente los aminoácidos 236-252 de SEQ ID NO: 2 (Figura 2B)); un dominio extracelular desde aproximadamente los aminoácidos 1-235 de SEQ ID NO: 2; y un dominio intracelular desde aproximadamente 253-538 de SEQ ID NO: 2. Se cree que la IL-21R/MU-1 humana madura tiene la secuencia de aminoácidos 20-538 de SEQ ID NO: 2.

El ADNc de IL-21R/MU-1 se depositó en the American Type Culture Collection el 10 de marzo de 1998, como número de acceso ATCC 98687.

Se puede usar cualquier forma de proteínas IL-21R/MU-1 de longitud inferior a la completa en los métodos y composiciones de la presente divulgación siempre y cuando mantenga la capacidad de unirse a un polipéptido de IL-21. Las proteínas TL-21R/MU-1 de longitud inferior a la completa, por ejemplo, IL-21R soluble, se pueden producir expresando un fragmento correspondiente del polinucleótido que codifica la proteína MU-1 de longitud completa en una célula huésped. Estos fragmentos de polinucleótidos correspondientes también son parte de la presente divulgación. Los polinucleótidos modificados como se han descrito anteriormente se pueden preparar mediante técnicas de biología molecular convencionales, incluyendo la construcción de mutantes de delección deseados apropiados, métodos de mutagénesis dirigida a un sitio o mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores de oligonucleótidos apropiados.

Como se usa en este documento, un "polipéptido de IL-21R/MU-1" soluble es un polipéptido de IL-21R/MU-1 incapaz de anclarse en una membrana. Tales polipéptidos solubles incluyen, por ejemplo, polipéptidos de MU-1 o IL-21R que carecen de una porción suficiente de su dominio que abarca la membrana para anclar el polipéptido o están modificados de tal manera que el dominio que abarca la membrana no es funcional. Por ejemplo, un fragmento soluble de una IL-21R (por ejemplo, un fragmento de una IL-21R que comprende el dominio extracelular de IL-21R murina o humana incluye una secuencia de aminoácidos desde aproximadamente los aminoácidos 1-235, 1-236, 20-235, 20-236 de SEQ ID NO:2 (humana), o desde aproximadamente los aminoácidos 1-236, 20-236 de SEQ ID NO:10 (murina). Un polipéptido de IL-21R/MU-1 soluble puede incluir adicionalmente, por ejemplo, ser fusionado a, una segunda unidad estructural, por ejemplo, un polipéptido (por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina, una secuencia de polipéptido GST, Lex-A o MBP). Por ejemplo, una proteína de fusión puede incluir al menos un fragmento de un polipéptido de IL-21R, que es capaz de unir IL-21, por ejemplo, un fragmento soluble de una IL-21R (por ejemplo, un fragmento de una IL-21R que comprende el dominio extracelular de IL-21R murina o humana; por ejemplo, desde aproximadamente los aminoácidos ácidos 1-235, 1-236, 20-235, 20-236 de SEQ ID NO:2 (humana), o desde aproximadamente los aminoácidos 1-236, 20-236 de SEQ ID NO:10 (murina), fusionado a una segunda unidad estructural, por ejemplo, un polipéptido (por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina, un fragmento Fc, unas regiones constantes de cadena pesada de los diversos isotipos, incluyendo: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, e IgE).

El término "interleucina-21" o "IL-21" se refiere a una citocina que muestra homología de secuencia con IL-2, IL-4 e IL-15 (Parrish-Novak et al. (2000) Nature 408:57-63). A pesar de la baja homología de secuencias entre las citocinas interleucinas, las citocinas comparten un pliegue común en una estructura de "haz de cuatro hélices" que es representativa de la familia. Se expresa principalmente en células T CD4+ activadas, y se ha informado que tiene efectos sobre las células NK, B y T (Parrish-Novak *et al.* (2000) *supra*; Kasaian, M.T. et al. (2002) *supra*). IL-21 se une a IL-21R (también denominado en este documento como MU-1 y NILR). Tras la unión a IL-21, la activación de IL-21R conduce a la señalización stat5 o stat3 (Ozaki et al. (2000) *supra*). El término "IL-21" o "polipéptido IL-21" se refiere a una proteína (preferiblemente de mamífero, por ejemplo, de origen murino o humano) que es capaz de interactuar con, por ejemplo, la unión a, IL-21R (preferiblemente de mamífero, por ejemplo, IL-21 murina o humana) y que tiene una de las siguientes características: (i) una secuencia de aminoácidos de una IL-21 de mamífero de origen natural o un fragmento de la misma, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 19 (humana) o un fragmento de la misma; (ii) una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga a, por ejemplo, al menos 85%, 90%, 95%, 98%, 99% homóloga a, una secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:19 (humana) o un fragmento de la misma; (iii) una secuencia de aminoácidos que está codificada por una secuencia de nucleótidos de IL-21 de mamífero de origen natural o un fragmento de la misma (por ejemplo, SEQ ID NO:18 (humana) o un fragmento de la misma); (iv) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente homóloga a, por ejemplo, al menos 85%, 90%, 95%, 98%, 99% homóloga a, una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:18 (humana) o un fragmento de la misma; (v) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos degenera a una secuencia de nucleótidos de IL-21 de origen natural o un fragmento de la misma, por ejemplo, SEQ ID NO:19 (humana) o un fragmento de la misma; o (vi) una secuencia de nucleótidos que se hibrida con una de las secuencias de secuencia de nucleótidos anteriores en condiciones estrictas, por ejemplo, condiciones altamente estrictas.

La expresión "una actividad biológica de" un polipéptido de MU-1 o IL-21R se refiere a una o más de las actividades biológicas de la correspondiente proteína MU-1 madura, incluyendo, pero sin limitarse a, (1) la interacción con, por ejemplo, la unión a, un polipéptido de IL-21; (2) asociación con moléculas de transducción de señal, por ejemplo, γ c, jak1; (3) estimulación de la fosforilación y/o activación de las proteínas stat, por ejemplo, stat 5 y/o stat3, y/o (4) modulación, por ejemplo, estimulación o disminución, proliferación, diferenciación, función de células efectoras, actividad citolítica, secreción de citocinas y/o supervivencia de células inmunes, por ejemplo, células T (células T CD8+, CD4+), células NK, células B, macrófagos y megacariocitos).

Como se usa en este documento, un "agonista de IL-21/IL-21R", que es útil en el método de la divulgación, se refiere a un agente que potencia, induce o mejora de otra manera una o actividades biológicas de un polipéptido de IL-21R/MU-1. Preferiblemente, el agonista interactúa con, por ejemplo, se une a, un polipéptido de IL-21R/MU-1.

Como se usa en este documento, un "antagonista de IL-21/IL-21R", que es útil en el método de la divulgación, se refiere a un agente que reduce, inhibe o disminuye de otra manera una o actividades biológicas de un polipéptido de IL-21R/MU-1. Preferiblemente, el antagonista interactúa con, por ejemplo, se une a, un polipéptido IL-21R/MU-1. El antagonismo usando un antagonista de IL-21/IL-21R no indica necesariamente una eliminación total de la actividad biológica del polipéptido de IL-21R/MU-1.

Como se usa en este documento, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agonista o antagonista de IL-21/IL-21R se refiere a una cantidad de un agente que es eficaz, tras la administración de dosis única o múltiple a un sujeto, por ejemplo, un paciente humano, al curar, reducir la gravedad de, mejorar uno o más síntomas de un trastorno o en prolongar la supervivencia del sujeto más allá de lo esperado en ausencia de tal tratamiento.

Como se usa en este documento, una "cantidad profilácticamente eficaz" de un agonista o antagonista de IL-21/IL-21R se refiere a una cantidad de un agente que es eficaz, tras la administración de dosis única o múltiple a un sujeto, por ejemplo, un paciente humano, para prevenir o retrasar la aparición de la aparición o reaparición de un trastorno, por ejemplo, un trastorno como se describe en este documento.

El término "inducir", "inhibir", "potenciar", "elevar", "aumentar", "disminuir" o similares, por ejemplo, que denotan diferencias cuantitativas entre dos estados, se refieren al menos a diferencias estadísticamente significativas entre los dos estados.

El término "en combinación" en este contexto significa que los agentes se dan sustancialmente al mismo tiempo, ya sea simultánea o secuencialmente. Si se administra secuencialmente, al comienzo de la administración del segundo compuesto, el primero de los dos compuestos es preferiblemente todavía detectable a concentraciones efectivas en el sitio de tratamiento.

Como se usa en este documento, una "proteína de fusión" se refiere a una proteína que contiene dos o más fracciones asociadas operativamente, por ejemplo, enlazadas, unidades estructurales, por ejemplo, unidades estructurales proteínas. Preferiblemente, las unidades estructurales están asociadas covalentemente. Las unidades estructurales se pueden asociar directamente o conectarse a través de un espaciador o un enlazador.

Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que comprende al menos una, y preferiblemente dos, regiones variables de cadena pesada (H) (abreviadas en este documento como VH), y al

menos una y preferiblemente dos, (En abreviatura en este documento como VL). Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" ("CDR"), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas "regiones del marco" (FR). La extensión de la región del marco y las CDR se ha definido con precisión (véase, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, and Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917. Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

El anticuerpo puede incluir adicionalmente una región constante de cadena pesada y ligera, para formar así una cadena de inmunoglobulina pesada y ligera, respectivamente. En una realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas de inmunoglobulina pesada y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, en el que las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera están interconectadas por, por ejemplo, enlaces disulfuro. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos median por lo general la unión del anticuerpo a tejidos o factores huésped, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

Como se usa en este documento, el término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Los genes reconocidos de la inmunoglobulina humana incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa (IgA1 y IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, epsilon y mu, así como los genes de la región variable de la inmunoglobulina miriada. Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos) están codificadas por un gen de región variable en el extremo de NH2 (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de región constante kappa o lambda en el extremo de COOH. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos), están codificadas de forma similar por un gen de región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de región constante mencionados anteriormente, por ejemplo, gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos).

Como se usa en este documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpos (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por genes de región constante de cadena pesada.

El término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo", o "fragmento"), tal como se usa en este documento descriptiva, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa que conservan la capacidad de unirse a un antígeno (por ejemplo, CD3). Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "fragmento de unión al antígeno", de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región aislada determinante de la complementariedad (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite fabricarse como una única cadena de proteína en la que el par de las regiones VL y VH se unen para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv), véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también están destinados para ser abarcados dentro del término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas para los expertos en el arte, y los fragmentos se seleccionan para su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

También son parte de esta solicitud secuencias similares o homólogas (por ejemplo, al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia) a las secuencias descritas en este documento. En algunas realizaciones, la identidad de secuencia puede ser desde aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más. Alternativamente, existe identidad sustancial cuando los segmentos de ácido nucleico se hibridarán en condiciones de hibridación selectiva (por ejemplo, condiciones de hibridación altamente estrictas), con el complemento de la hebra. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura.

Los cálculos de "homología" o "identidad de secuencia" entre dos secuencias (los términos se usan indistintamente en este documento) se llevan a cabo de la siguiente manera. Las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir brechas en uno o ambos de una primera y segunda secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos para la alineación óptima y las secuencias no homólogas pueden ser descartadas para fines de comparación). En una realización preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada con fines de comparación es al menos 30%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 60%, e incluso más preferiblemente al menos 70%, 80%, 90%, 100% de la longitud de la secuencia de referencia. A continuación, se comparan los residuos de aminoácidos o los

nucleótidos en las correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en este documento, la "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de brechas y la longitud de cada brecha, que necesitan ser introducidos para una alineación óptima de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede llevar a cabo utilizando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo Needleman and Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando ya sea una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de brecha de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En incluso otra realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de brecha de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Un conjunto de parámetros particularmente preferido (y el que se debe utilizar si el médico no está seguro de qué parámetros deben aplicarse para determinar si una molécula está dentro de una identidad de secuencia o una limitación de homología de la invención) es un matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización de brecha de 12, una penalización extendida de brecha de 4, y una penalización de brecha de cambio de marco de 5. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos también se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers and W. Miller ((1989) CABIOS, 4:11-17) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de brecha de 12 y una penalización de brecha de 4.

Como se usa en este documento, el término "hibrida bajo condiciones estrictas" describe las condiciones para la hibridación y el lavado. Las condiciones estrictas son conocidas para los expertos en el arte y se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Métodos acuosos y no acuosos se describen en esa referencia y cualquiera puede ser usado. Un ejemplo preferido de condiciones de hibridación estrictas son la hibridación en cloruro de sodio 6X/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en SSC 0.2X, SDS al 0.1% a 50°C. Otro ejemplo de condiciones de hibridación estrictas son la hibridación en SSC 6X a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en SSC 0.2X, SDS al 0.1% a 55°C. Otro ejemplo de condiciones de hibridación estrictas son la hibridación en SSC 6X a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en SSC 0.2X, SDS al 0.1% a 60°C. Preferiblemente, las condiciones de hibridación estrictas son hibridación en SSC 6X a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en SSC 0.2X, SDS al 0.1% a 65°C. Las condiciones altamente estrictas particularmente preferidas (y las condiciones que deben usarse si el médico no está seguro de qué condiciones deben aplicarse para determinar si una molécula está dentro de una limitación de hibridación de la invención) son fosfato de sodio 0.5 M, SDS al 7% a 65°C, seguido de uno o más lavados a SSC 0.2X, SDS al 1% a 65°C.

Se entiende que los agonistas y antagonistas de IL-21/IL-21R descritos y/o reivindicados pueden tener sustituciones adicionales de aminoácidos conservadores o no esenciales, que no tienen un efecto sustancial sobre sus funciones.

Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es aquella en la que el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se usa en este documento, se pretende que se refiera a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Se debe entender que tales términos pretenden referirse no sólo a la célula objeto en particular, sino a la progenie de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones posteriores debido a ya sea mutaciones o influencias ambientales, tal progenie no puede, de hecho, ser idéntica a la célula madre, pero todavía se incluyen dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en este documento.

Agonistas y antagonistas de IL-21/IL-21R

En una realización, un polipéptido de IL-21R/MU-1 o sus fragmentos activos del mismo se pueden fusionar a una segunda unidad estructural, por ejemplo, una inmunoglobulina o un fragmento de la misma (por ejemplo, un fragmento de unión a Fc del mismo). Por ejemplo, las formas solubles de la IL-21R/MU-1 se pueden fusionar a través de secuencias "enlazadoras" a la porción Fc de una inmunoglobulina. También se pueden utilizar otras proteínas de fusión, tales como aquellas con GST, Lex-A o MBP.

- Las proteínas de fusión pueden incluir adicionalmente una secuencia enlazadora que une el fragmento de IL-21 o IL-21R a la segunda unidad estructural. Por ejemplo, la proteína de fusión puede incluir un enlazador del péptido, por ejemplo, un enlazador del péptido de aproximadamente 4 a 20, más preferiblemente, 5 a 10, aminoácidos de longitud; el enlazador del péptido tiene 8 aminoácidos de longitud. Cada uno de los aminoácidos en el enlazador del péptido se selecciona del grupo que consiste en Gly, Ser, Asn, Thr y Ala; el enlazador del péptido incluye un elemento Gly-Ser. En otras realizaciones, la proteína de fusión incluye un enlazador del péptido y el enlazador del péptido incluye una secuencia que tiene la fórmula (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly) y en el que, y es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8.
- En otras realizaciones, se pueden adicionar secuencias de aminoácidos adicionales al extremo N o C de la proteína de fusión para facilitar la expresión, detección y/o aislamiento o purificación. Por ejemplo, proteína de fusión de IL-21/IL-21R se puede unir a una o más unidades estructurales adicionales, por ejemplo, GST, etiqueta His6, etiqueta FLAG. Por ejemplo, la proteína de fusión se puede unir adicionalmente a una proteína de fusión GST en la que las secuencias de la proteína de fusión se fusionan al extremo C de las secuencias de GST (esto es, glutatión S-transferasa). Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de la proteína de fusión MU-1.
- En otra realización, la proteína de fusión incluye una secuencia señal heteróloga (esto es, una secuencia de polipéptido que no está presente en un polipéptido codificado por un ácido nucleico Mu-1) en su extremo N. Por ejemplo, la secuencia señal Mu-1 nativa puede ser eliminada y reemplazada por una secuencia señal de otra proteína. En ciertas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamífero), la expresión y/o la secreción de Mu-1 se pueden incrementar mediante el uso de una secuencia señal heteróloga.
- Una proteína quimérica o de fusión de la divulgación se puede producir mediante técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptidos se ligan entre sí en el marco de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, empleando terminales de extremos romos o terminados en escalones para la unión, digestión con enzimas de restricción para proporcionar terminales apropiados, llenado de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión indeseable y la unión enzimática. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos génicos se pueden llevar a cabo usando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos que pueden ser posteriormente hibridados y reamplificados para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Ausubel et al. (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Además, muchos vectores de expresión están comercialmente disponibles que codifican una unidad estructural de fusión (por ejemplo, una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina). Un ácido nucleico que codifica Mu-1 se puede clonar en dicho vector de expresión de tal manera que la unidad estructural de fusión esté unida en marco a la proteína de inmunoglobulina.
- En algunas realizaciones, los polipéptidos de fusión MU-1 existen como oligómeros, tales como dímeros o trímeros.
- El primer polipéptido, y/o ácidos nucleicos que codifican el primer polipéptido, se pueden construir usando métodos conocidos en la técnica.
- En algunas realizaciones, la unidad estructural polipéptido Mu-1 se proporciona como un polipéptido Mu-1 variante que tiene una mutación en la secuencia de Mu-1 de origen natural (tipo salvaje) que dio como resultado una unión de mayor afinidad (respecto a la secuencia no mutada) del polipéptido Mu-1 a una IL-21.
- En algunas realizaciones, la unidad estructural polipéptido Mu-1 se proporciona como un polipéptido variante Mu-1 que tiene mutaciones en la secuencia Mu-1 de origen natural (tipo salvaje) que dio como resultado una secuencia Mu-1 más resistente a la proteólisis (respecto a la secuencia no-mutada).
- En algunas realizaciones, el primer polipéptido incluye el polipéptido Mu-1 de longitud completa. Alternativamente, el primer polipéptido comprende polipéptido Mu-1 de longitud inferior a la completa.
- Un péptido señal que se puede incluir en la proteína de fusión es MPLLLLLLLLPSPLHP (SEQ ID NO:21). Si se desea, se pueden insertar adicionalmente uno o más aminoácidos entre la primera unidad estructural polipéptido que comprende la unidad estructural Mu-1 y la segunda unidad estructural polipéptido.
- El segundo polipéptido es preferiblemente soluble. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido aumenta la solubilidad, (por ejemplo, la solubilidad en suero) del polipéptido unido. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido incluye una secuencia que facilita la asociación del polipéptido de fusión con un segundo polipéptido Mu-1. En realizaciones preferidas, el segundo polipéptido incluye al menos una región de un polipéptido de inmunoglobulina. Los polipéptidos de fusión de inmunoglobulina son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,516,964; 5,225,538; 5,428,130; 5,514,582; 5,714,147; y 5,455,165.
- En algunas realizaciones, el segundo polipéptido comprende un polipéptido de inmunoglobulina de longitud completa. Alternativamente, el segundo polipéptido comprende menos del polipéptido de inmunoglobulina de longitud completa, por ejemplo, una cadena pesada, cadena ligera, Fab, Fab₂, Fv o Fc. Preferiblemente, el segundo

polipéptido incluye la cadena pesada de un polipéptido de inmunoglobulina. Más preferiblemente, el segundo polipéptido incluye la región Fc de un polipéptido de inmunoglobulina.

5 En otro aspecto de la divulgación, el segundo polipéptido tiene menos función efectora que la función efectora de una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina de tipo salvaje. La función efectora de Fc incluye, por ejemplo, la unión al receptor Fc, la fijación del complemento y la actividad de agotamiento de las células T (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,136,310). Los métodos para ensayar la actividad de agotamiento de las células T, la función efectora de Fc y la estabilidad del anticuerpo son conocidos en la técnica. En una realización, el segundo polipéptido tiene poca o ninguna afinidad para el receptor Fc. En una realización alternativa, el segundo polipéptido tiene baja o ninguna afinidad para la proteína de complemento C1q.

10 Una segunda secuencia de polipéptidos preferida incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17. Esta secuencia incluye una región Fc. Los aminoácidos subrayados son aquellos que difieren del aminoácido encontrado en la posición correspondiente de la secuencia de inmunoglobulina de tipo salvaje:

```

HTCPPCPAPEALGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN.
K
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
P
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
Q
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:17)
    
```

15 Ejemplos de proteínas de fusión antagónicas que se pueden usar en los métodos de la divulgación se muestran en las figuras 7-15. En una realización, la proteína de fusión incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de, por ejemplo, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:37, o SEQ ID NO:39, o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma. En otras realizaciones, la proteína de fusión incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada de, por ejemplo, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, o SEQ ID NO:38, o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma. Las proteínas de fusión preferidas tienen la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:25 o SEQ ID NO:29 (Figuras 8A-8C y 10A-10C, respectivamente), o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma. En otras realizaciones, la proteína de fusión incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada de, por ejemplo, SEQ ID NO:24 o SEQ ID NO:28 (Figuras 8A-8C y 10A-10C, respectivamente), o una secuencia al menos 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a la misma. Más preferiblemente, la proteína de fusión tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:29, o tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:28 (Figura 10A-10C).

20 En otras realizaciones, los agonistas o antagonistas de IL-21/IL-21R son anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a IL-21 o IL-21R, preferiblemente a IL-21 o IL-21R de mamífero (por ejemplo, humana o murina).

25 Las proteínas MU-1 de la divulgación también se pueden usar para inmunizar animales para obtener anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con la proteína MU-1 y que pueden inhibir la unión de ligandos al receptor. Tales anticuerpos se pueden obtener utilizando la MU-1 entera como un inmunógeno, o utilizando fragmentos de MU-1. También se pueden usar fragmentos más pequeños de MU-1 para inmunizar animales. Además, los inmunógenos de péptidos pueden contener un residuo de cisteína en el extremo carboxilo, y se conjugan con un hapteno tal como hemocianina de lapa (KLH). Se pueden generar inmunógenos peptídicos adicionales reemplazando los residuos de tirosina con residuos de tirosina sulfatados. Los métodos para sintetizar tales péptidos son conocidos en la técnica, por ejemplo, como en R. P. Merrifield, J.Amer.Chem.Soc. 85, 2149-2154 (1963); J. L. Krstenansky, et al., FEBS Lett. 211, 10 (1987).

30 Los anticuerpos neutralizantes o no neutralizantes (preferiblemente anticuerpos monoclonales) que se unen a la proteína MU-1 pueden ser también útiles en el tratamiento de las afecciones descritas anteriormente. Estos anticuerpos monoclonales neutralizantes pueden ser capaces de bloquear la unión del ligando a la cadena del receptor MU-1.

35 La presente divulgación y/o reivindicaciones proporcionan además composiciones que comprenden un anticuerpo que reacciona específicamente con una IL-21 o una IL-21R.

40 Los anticuerpos monoclonales humanos (mAbs) dirigidos contra IL-21 o IL-21R se pueden generar usando ratones transgénicos que llevan los genes de inmunoglobulina humana en lugar del sistema de ratón. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos inmunizados con el antígeno de interés se usan para producir hibridomas que segregan mAbs humanos con afinidades específicas para epítopos de una proteína humana (véase, por ejemplo, Wood et al.

International Application WO 91/00906, Kucherlapati et al. PCT publication WO 91/10741; Lonberg et al. International Application WO 92/03918; Kay et al. International Application 92/03917; Lonberg, N. et al. 1994 Nature 368:856-859; Green, L.L. et al. 1994 Nature Genet. 7:13-21; Morrison, S.L. et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855; Bruggeman et al. 1993 Year Immunol 7:33-40; Tuailon et al. 1993 PNAS 90:3720-3724; Bruggeman et al. 1991 Eur J Immunol 21:1323-1326).

Los anticuerpos monoclonales también se pueden generar por otros métodos conocidos para los expertos en el arte de la tecnología del ADN recombinante. Se ha desarrollado un método alternativo, denominado como el método de "expresión de anticuerpo combinatoria", para identificar y aislar fragmentos de anticuerpos que tienen una especificidad específica de antígeno, y se puede utilizar para producir anticuerpos monoclonales (para las descripciones de expresión de anticuerpo combinatoria véase, por ejemplo, Sastry et al. 1989 PNAS 86:5728; Huse et al. 1989 Science 246:1275; y Orlandi et al. 1989 PNAS 86:3833). Después de inmunizar a un animal con un inmunógeno como se ha descrito anteriormente, se clona el repertorio de anticuerpos del conjunto de células B resultante. Se conocen generalmente métodos para obtener la secuencia de ADN de las regiones variables de una diversa población de moléculas de inmunoglobulina usando una mezcla de cebadores de oligómeros y PCR. Por ejemplo, se pueden usar cebadores de oligonucleótidos mixtos correspondientes a las secuencias líder 5' (péptido señal) y/o secuencias de marco 1 (FR1), así como un cebador a un cebador de región constante 3' conservado, para la amplificación por PCR de las regiones variables de cadena pesada y ligera de un número de anticuerpos murinos (Larrick et al., 1991, Biotechniques 11: 152-156). Una estrategia similar también se puede usar para amplificar regiones variables de cadena pesada y ligera humana a partir de anticuerpos humanos (Larrick et al., 1991, Methods: Companion to Methods in Enzymology 2:106-110).

Los anticuerpos quiméricos, incluyendo cadenas de inmunoglobulina quiméricas, se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Por ejemplo, un gen que codifica la región constante Fc de una molécula de anticuerpo monoclonal murina (u otra especie) se digiere con enzimas de restricción para eliminar la región que codifica la Fc murina y la porción equivalente de un gen que codifica una región constante Fc humana se sustituye (Véase Robinson et al., WO 87/02671; Akira, et al., European Patent Application 184,187; Taniguchi, M., European Patent Application 171,496; Morrison et al., European Patent Application 173,494; Neuberger et al., International Application WO 86/01533; Cabilly et al. U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly et al., European Patent Application 125,023; Better et al. (1988 Science 240:1041-1043); Liu et al. (1987) PNAS 84:3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al. (1987) PNAS 84:214-218; Nishimura et al., 1987, Canc. Res. 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-449; y Shaw et al., 1988, J. Natl Cancer Inst. 80:1553-1559).

Un anticuerpo o una cadena de inmunoglobulina se puede humanizar por métodos conocidos en la técnica. Se pueden generar anticuerpos humanizados, incluyendo cadenas humanizadas de inmunoglobulina, reemplazando secuencias de la región variable de Fv que no están directamente implicadas en la unión del antígeno con secuencias equivalentes de regiones variables de Fv humano. Los métodos generales para generar anticuerpos humanizados son proporcionados por Morrison, S. L., 1985, Science 229:1202-1207, de Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214, y por Queen et al. US 5,585,089, US 5,693,761 y US 5,693,762,

Estos métodos incluyen aislar, manipular, y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican la totalidad o parte de regiones variables de Fv de inmunoglobulina a partir de al menos una de una cadena pesada o ligera. Las fuentes de dicho ácido nucleico son bien conocidas para los expertos en el arte y, por ejemplo, se pueden obtener a partir de un hibridoma que produce un anticuerpo frente a un objetivo predeterminado. El ADN recombinante que codifica el anticuerpo humanizado, o fragmento del mismo, puede entonces clonarse en un vector de expresión apropiado.

Se pueden producir moléculas o inmunoglobulinas de anticuerpo injertadas en CDR o humanizadas mediante injerto de CDR o sustitución de CDR, en el que se pueden reemplazar una, dos o todas las CDR de una cadena de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 5,225,539; Jones et al. 1986 Nature 321:552-525; Verhoeyan et al. 1988 Science 239:1534; Beidler et al. 1988 J. Immunol. 141:4053-4060; Winter US 5,225,539.

Winter describe un método de injerto de CDR que se puede usar para preparar los anticuerpos humanizados descritos y/o reivindicados en este documento (Solicitud de Patente Británica GB 2188638A, presentada el 26 de marzo de 1987, Winter US 5,225,539), Todas las CDR de un anticuerpo humano particular

se pueden reemplazar por al menos una porción de una CDR no humana o solo algunas de las CDR se pueden reemplazar por CDR no humanas. Sólo es necesario reemplazar el número de CDR requeridas para la unión del anticuerpo humanizado a un antígeno predeterminado.

También se describen y/o se reivindican anticuerpos monoclonales, quiméricos y humanizados, que han sido modificados, por ejemplo, suprimiendo, adicionando o sustituyendo otras porciones del anticuerpo, por ejemplo, la región constante. Por ejemplo, un anticuerpo se puede modificar de la siguiente manera: (i) suprimiendo la región constante; (ii) sustituyendo la región constante por otra región constante, por ejemplo, una región constante destinada a aumentar la semivida, la estabilidad o afinidad del anticuerpo, o una región constante de otra especie o clase de anticuerpos; o (iii) modificando uno o más aminoácidos en la región constante para alterar, por ejemplo, el

número de sitios de glicosilación, la función de las células efectoras, la unión del receptor Fc (FcR), la fijación del complemento, entre otros.

5 En la técnica se conocen métodos para alterar una región constante de anticuerpo. Los anticuerpos con función alterada, por ejemplo, la afinidad alterada para un ligando efector, tal como FcR en una célula, o el componente C1 de complemento se puede producir reemplazando al menos un residuo de aminoácido en la porción constante del anticuerpo con un residuo diferente (véase, por ejemplo, EP 388,151 A1, US 5,624,821 y US 5,648,260).

Se podrían describir tipos similares de alteraciones que,

si se aplican a la murina u otras especies de inmunoglobulina, reducirían o eliminarían estas funciones.

10 Por ejemplo, es posible alterar la afinidad de una región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, una IgG, tal como una IgG humana) para una FcR (por ejemplo, Fc gamma R1), o para la unión C1q reemplazando el(los) residuo(s) especificado(s) con un residuo o residuos que tienen una funcionalidad apropiada en su cadena lateral, o introduciendo un grupo funcional cargado, tal como glutamato o aspartato, o tal vez un residuo no polar aromático tal como fenilalanina, tirosina, triptófano o alanina (véase, por ejemplo, US 5,624,821).

15 Las secuencias de aminoácidos de polipéptidos de IL-21 son conocidas públicamente. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos de una IL-21 humana está disponible en No. de Acc. Genbank X_011082. La secuencia de nucleótidos de IL-21 humana descrita se presenta a continuación:

```

1 gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactggtg gtacttatga
gatccagtcc
61 tggcaacatg gagaggattg tcatctgtct gatggtcctc ttcttgggga
cactggtcca
121 caaatcaagc tcccaaggtc aagatcgcca catgattaga atgogtcaac
ttatagatat
181 tgttgatcag ctgaaaaatt atgtgaatga ottggtcctc gaatttotgc
cagctccaga
241 agatgtagag acaaactgtg agtggtcagc ttttctctgc tttcagaagg
cccaactaaa
301 gtcagcaaat acaggaaaca atgaaaggat aatcaatgta tcaattaaaa
agctgaagag
361 gaaaccacct tccacaaatg cagggagaag acagaaacac agactaacat
gcccttcattg
421 tgattcttat gagaaaaaac cacccaaaga attcctagaa agattcaaat
cacttctcca
481 aaagatgatt catcagcctc tgcctctag aacacacgga agtgaagatt
cctgaggatc
541 taacttgcag ttggacacta tgttacatac totaatatag tagtgaaagt
catttctttg
601 tattccaagt ggaggag (SEQ ID NO:18)

```

La secuencia de aminoácidos del polipéptido de IL-21 humana descrito se presenta a continuación:

```

MRSSPGNMERIVICLMVIFLGLTVHKSSSQGDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPE
FLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIIKKLKRKPPSTNAGRROKH
RLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO:19)

```

20 La divulgación también abarca ácidos nucleicos que se hibridan con la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, o SEQ ID NO:38, bajo condiciones altamente estrictas (por ejemplo, SSC 0.1X a 65°C.). Los polinucleótidos aislados que codifican proteínas MU-1 o proteínas de fusión, pero que difieren de la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, o SEQ ID NO:38, en virtud de la degeneración del código genético están también abarcadas por la presente divulgación. Variaciones en la secuencia de nucleótidos como se expone en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:36, o SEQ ID NO:38, que son causadas por mutaciones puntuales o por modificaciones inducidas también se incluyen en la divulgación

- Los polinucleótidos aislados de la divulgación pueden estar operativamente unidos a una secuencia de control de expresión tal como los vectores de expresión pMT2 o pED descritos en Kaufman et al., *Nucleic Acids Res.* 19,4485-4490 (1991), con el fin de producir la proteína MU-1 recombinantemente. Muchas secuencias de control de expresión apropiadas son conocidas en la técnica. También se conocen métodos generales de expresión de proteínas recombinantes y se ejemplifican en R. Kaufman, *Methods in Enzymology* 185, 537-566 (1990). Como se define en este documento, "unido operativamente" significa unido enzimáticamente o químicamente para formar un enlace covalente entre el polinucleótido aislado de la divulgación y la secuencia de control de expresión, de tal manera que la proteína MU-1 se expresa mediante una célula huésped que ha sido transformada (transfectada) con la secuencia de polinucleótido unido/control de la expresión.
- El término "vector", como se utiliza en este documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que ha sido unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que segmentos de ADN adicionales se pueden ligar al genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamíferos episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episómicos) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped, y así se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se denominan en este documento como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. La presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" se puede usar indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente utilizada. Sin embargo, se pretende que la divulgación incluya otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus defectuosos de replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven funciones equivalentes.
- El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Los expertos en el arte apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de células huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados del promotor FF-1a y BGH poli A, citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/potenciador de CMV), virus Simian 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Para una descripción adicional de los elementos reguladores virales y secuencias de los mismos, véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,168,062 de Stinski, la Patente de los Estados Unidos No. 4,510,245 de Bell et al. y la Patente de los Estados Unidos No. 4,968,615 de Schaffner et al.
- Los vectores de expresión recombinantes de la divulgación pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Nos. 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017, todos de Axel et al.). Por ejemplo, por lo general el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, sobre una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped de dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418).
- Un número de tipos de células pueden actuar como células huésped apropiadas para la expresión de la proteína MU-1 o proteína de fusión del mismo. Se puede hacer cualquier tipo de célula capaz de expresar la proteína funcional MU-1. Las células huésped de mamífero apropiadas incluyen, por ejemplo, células COS de mono, células Ovario de Hámster Chino (CHO), células 293 de riñón humano, células A431 humanas epidérmicas, células Colo205 humanas, células 3T3, células CV-1, otras líneas celulares de primate transformadas, células diploides normales, cepas celulares derivadas del cultivo *in vitro* de tejido primario, explantes primarios, células HeLa, células L de ratón, células BHK, HL-60, U937, HaK, Rat2, BaF3, 32D, FDCP-1, PC12, M1x o C2C12.
- La proteína MU-1 o la proteína de fusión del mismo también se puede producir uniendo operativamente el polinucleótido aislado de la divulgación a secuencias de control apropiadas en uno o más vectores de expresión de insectos, y empleando un sistema de expresión de insectos. Los materiales y métodos para los sistemas de expresión de baculovirus/células de insecto están comercialmente disponibles en forma de kit de, por ejemplo, Invitrogen, San Diego, Calif. U.S.A. (el kit MaxBac®), y tales métodos son bien conocidos en la técnica, como se describe en Summers and Smith, *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin* No. 1555 (1987). También se

pueden producir formas solubles de la proteína MU-1 en células de insecto usando polinucleótidos aislados apropiados como se describe anteriormente.

5 Alternativamente, la proteína MU-1 o proteína de fusión del mismo, se puede producir en eucariotas inferiores tales como levadura o en procariotas tales como bacterias. Las cepas de levadura apropiadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, cepas *Kluyveromyces*, *Candida*, o cualquier cepa de levadura capaz de expresar proteínas heterólogas. Las cepas bacterianas apropiadas incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, o cualquier cepa bacteriana capaz de expresar proteínas heterólogas.

10 La expresión en bacterias puede dar como resultado la formación de cuerpos de inclusión que incorporan la proteína recombinante. De este modo, se puede requerir el replegamiento de la proteína recombinante con el fin de producir material activo o más activo. En la técnica se conocen varios métodos para obtener proteínas heterólogas plegadas correctamente a partir de cuerpos de inclusión bacterianos. Estos métodos generalmente implican solubilizar la proteína de los cuerpos de inclusión, desnaturalizando luego la proteína completamente usando un agente caotrópico. Cuando los residuos de cisteína están presentes en la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína, a menudo es necesario llevar a cabo el replegamiento en un entorno que permite la formación correcta de enlaces disulfuro (un sistema redox). Los métodos generales de replegamiento se describen en Kohno, *Meth. Enzym.*, 185:187-195 (1990). El documento EP 0433225 y el documento US 5,399,677 correspondiente describen otros métodos apropiados.

20 La proteína MU-1 o proteína de fusión del mismo también se puede expresar como un producto de animales transgénicos, por ejemplo, como un componente de la leche de vacas transgénicas, cabras, cerdos u ovejas que se caracterizan por células somáticas o germinales que contienen una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína MU-1 o una proteína de fusión de la misma.

25 La proteína MU-1 o proteína de fusión del mismo se puede preparar cultivando células huésped transformadas con un cultivo en condiciones de cultivo necesarias para expresar la proteína deseada. La proteína expresada resultante puede entonces purificarse a partir del medio de cultivo o extractos celulares. Las formas solubles de la proteína MU-1 o proteína de fusión del mismo se pueden purificar a partir de medios acondicionados. Las formas unidas a membrana de la proteína MU-1 de la divulgación se pueden purificar preparando una fracción de membrana total de la célula de expresión y extrayendo las membranas con un detergente no iónico tal como Triton X-100.

30 La proteína MU-1 o la proteína de fusión se puede purificar usando métodos conocidos para los expertos en el arte. Por ejemplo, la proteína MU-1 de la divulgación se puede concentrar usando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado se puede aplicar a una matriz de purificación tal como un medio de filtración en gel. Alternativamente, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo (DEAE) o polietohetilenimina (PEI) colgantes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. Alternativamente, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos apropiados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren grupos sulfopropilo (por ejemplo, columnas de S-Sepharose®). La purificación de la proteína MU-1 o proteína de fusión del sobrenadante de cultivo puede incluir también uno o más etapas de columna sobre resinas de afinidad tales como concanavalina A-agarosa, heparina-toyopearl® o Cibacrom blue 3GA Sepharose®; o por cromatografía de interacción hidrófoba utilizando tales resinas como fenil éter, butil éter o propil éter; o por cromatografía de inmunoafinidad. Por último, se pueden emplear una o más etapas de cromatografía líquida de alta resolución (RP-HPLC) de fase inversa que emplean medios RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, sílica gel que tiene grupos metilo u otros grupos alifáticos colgantes, para purificar adicionalmente la proteína MU-1. Las columnas de afinidad que incluyen anticuerpos para la proteína MU-1 también se pueden usar en la purificación de acuerdo con métodos conocidos. También se pueden emplear algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones o con otros métodos conocidos, para proporcionar una proteína recombinante aislada sustancialmente purificada. Preferiblemente, la proteína MU-1 aislada se purifica de manera que esté sustancialmente libre de otras proteínas de mamífero.

50 Las proteínas MU-1 o las proteínas de fusión de la divulgación también se pueden usar para seleccionar agentes que son capaces de unirse a MU-1. Los ensayos de unión usando una proteína de unión deseada, inmovilizada o no, son bien conocidos en la técnica y se pueden usar para este propósito usando la proteína MU-1 de la divulgación. Se pueden usar ensayos de selección basados en células purificadas o basados en proteínas (libres de células) para identificar tales agentes. Por ejemplo, la proteína MU-1 se puede inmovilizar en forma purificada sobre un portador y se pueden medir ligandos potenciales o de unión a la proteína MU-1 purificada.

Composiciones farmacéuticas

55 Los agonistas o antagonistas de IL-21/IL-21R se pueden usar como una composición farmacéutica cuando se combinan con un portador farmacéuticamente aceptable. Dicha composición puede contener, además de los agonistas o antagonistas de IL-21/IL-21R y portador, diversos diluyentes, cargas, sales, soluciones reguladoras, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales bien conocidos en la técnica. El término "farmacéuticamente

aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente o ingredientes activos. Las características del portador dependerán de la ruta de administración.

5 La composición farmacéutica descrita y/o reivindicada en este documento también puede contener citocinas, linfoquinas u otros factores hematopoyéticos tales como M-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, G-CSF, factor de células madre, y eritropoyetina. La composición farmacéutica también puede incluir anticuerpos anticitoquina como se describe con más detalle a continuación. La composición farmacéutica puede contener factores trombolíticos o anti-trombóticos tales como activador de plasminógeno y Factor VIII. La composición farmacéutica puede contener además otros agentes antiinflamatorios como se describe con más detalle a continuación. Tales factores y/o agentes adicionales se pueden incluir en la composición farmacéutica para producir un efecto sinérgico con agonistas o antagonistas de IL-21/IL-21R, o para minimizar los efectos secundarios causados por los agonistas o antagonistas de IL-21/IL-21R. Por el contrario, los agonistas o antagonistas de IL-21/IL-21R se pueden incluir en formulaciones de la citocina particular, linfoquina, otro factor hematopoyético, factor trombolítico o anti-trombótico o agente antiinflamatorio para minimizar los efectos secundarios de la citocina, la linfoquina, otro factor hematopoyético, un factor trombolítico o anti-trombótico o un agente antiinflamatorio.

20 La composición farmacéutica descrita y/o reivindicada en este documento puede estar en forma de un liposoma en la que se combinan agonistas o antagonistas de IL-21/IL-21R, además de otros portadores farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos tales como lípidos que existen en forma agregada como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos o capas laminares que en solución acuosa. Los lípidos apropiados para la formulación liposómica incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfatidos, lisolectina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. La preparación de tales formulaciones liposómicas está dentro del nivel de experiencia en la técnica, como se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 4,235,871; la Patente de los Estados Unidos No. 4,501,728; la Patente de los Estados Unidos No. 4,837,028; y la Patente de los Estados Unidos No. 4,737,323.

25 Como se usa en este documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad total de cada componente activo de la composición o método farmacéutico que es suficiente para mostrar un beneficio significativo para el paciente, por ejemplo, mejora de los síntomas de, curación o aumento en la velocidad de curación de tales afecciones. Cuando se aplica a un ingrediente activo individual, administrado solo, el término se refiere únicamente a ese ingrediente. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los ingredientes activos que dan lugar al efecto terapéutico, ya sea administrado en combinación, en serie o simultáneamente.

35 En la práctica del método de tratamiento o uso de la presente divulgación se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista o antagonista de IL-21/IL-21R a un sujeto, por ejemplo, un mamífero (por ejemplo, un humano). Se pueden administrar agonistas o antagonistas de IL-21/IL-21R de acuerdo con el método de la divulgación ya sea solo o en combinación con otras terapias tales como tratamientos que emplean citocinas, linfoquinas u otros factores hematopoyéticos, o agentes antiinflamatorios. Cuando se coadministra con uno o más agentes, se puede administrar un agente de unión a IL-21 y/o IL-21R simultáneamente con el segundo agente, o secuencialmente. Si se administra secuencialmente, el médico tratante decidirá la secuencia apropiada de administración de un agonista o antagonista de IL-21/IL-21R en combinación con otros agentes.

40 La administración de un agonista o antagonista de IL-21/IL-21R usado en la composición farmacéutica o para practicar el método de la presente divulgación se pueden llevar a cabo de una variedad de formas convencionales, tales como ingestión oral, inhalación o inyección cutánea, subcutánea o intravenosa. Se prefiere la administración intravenosa al paciente.

45 Cuando se administra oralmente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista o antagonista de IL-21/IL-21R, el agente de unión estará en forma de comprimido, cápsula, polvo, solución o elixir. Cuando se administra en forma de comprimido, la composición farmacéutica descrita y/o reivindicada en este documento puede contener adicionalmente un portador sólido tal como una gelatina o un adyuvante. El comprimido, la cápsula y el polvo contienen desde aproximadamente 5 a 95% de agente de unión, y preferiblemente desde aproximadamente 25 a 90% de agente de unión. Cuando se administra en forma líquida, se puede adicionar un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites de origen animal o vegetal tales como aceite de cacahuete, aceite mineral, aceite de soja o aceite de sésamo o aceites sintéticos. La forma líquida de la composición farmacéutica puede contener además solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Cuando se administra en forma líquida, la composición farmacéutica contiene desde aproximadamente 0.5 a 90% en peso del agente de unión, y preferiblemente desde aproximadamente 1 a 50% del agente de unión.

60 Cuando una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista o antagonista de IL-21/IL-21R es administrada por inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, el agente de unión estará en forma de una solución acuosa libre de pirógenos, parenteralmente aceptable. La preparación de tales soluciones de proteínas parenteralmente aceptables, teniendo debidamente en cuenta el pH, la isotonicidad, la estabilidad, y similares, está dentro de la habilidad en la técnica. Una composición farmacéutica preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea debe contener,

además del agente de unión, un vehículo isotónico tal como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de cloruro de sodio y dextrosa, inyección de Ringer con lactato u otro vehículo como se conoce en la técnica. La composición farmacéutica descrita y/o reivindicada en este documento también puede contener estabilizantes, conservantes, soluciones reguladoras, antioxidantes u otro aditivo conocido para los expertos en el arte.

La cantidad de un agonista o antagonista de IL-21/IL-21R en la composición farmacéutica descrita y/o reivindicada en este documento dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección que se esté tratando y de la naturaleza de tratamientos previos que el paciente ha sufrido. En última instancia, el médico tratante decidirá la cantidad de agente de unión con la que tratar a cada paciente individual. Inicialmente, el médico tratante administrará dosis bajas de agente de unión y observará la respuesta del paciente. Se pueden administrar dosis mayores de agente de unión hasta que se obtiene el efecto terapéutico óptimo para el paciente, y en ese momento la dosis no se aumenta generalmente más. Se contempla que las diversas composiciones farmacéuticas utilizadas para practicar el método de la presente divulgación deben contener aproximadamente 0.1 µg a aproximadamente 100 mg de agonista o antagonista de IL-21/IL-21R por kg de peso corporal.

La duración de la terapia intravenosa usando la composición farmacéutica de la presente divulgación variará, dependiendo de la gravedad de la enfermedad que se esté tratando y de la condición y de la respuesta idiosincrática potencial de cada paciente individual. Se contempla que la duración de cada aplicación del agonista o antagonista de IL-21/IL-21R estará en el intervalo de 12 a 24 horas de administración intravenosa continua. En última instancia, el médico tratante decidirá la duración apropiada de la terapia intravenosa utilizando la composición farmacéutica descrita y/o reivindicada en este documento.

Se espera que el polinucleótido y las proteínas descritos y/o reivindicados en este documento presenten uno o más de los usos o actividades biológicas (incluyendo aquellos asociados con ensayos citados en este documento) identificados a continuación. Se pueden proporcionar usos o actividades descritos para las proteínas descritas y/o reivindicadas en este documento por administración o uso de tales proteínas o por administración o uso de polinucleótidos que codifican dichas proteínas (tales como, por ejemplo, en terapias génicas o vectores apropiados para la introducción de ADN).

Uso de agonistas de IL-21/IL-21R para mejorar una respuesta inmune

En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para aumentar la proliferación de células inmunes, por ejemplo, células T (por ejemplo, células T CD8+) poniendo en contacto una célula inmune o una población de células inmunes con un agente de unión de IL-21 o IL-21R que potencia o mejora la actividad de un polipéptido de IL-21. Estos métodos se basan, al menos en parte, en el hallazgo de que un agente de unión al agonista IL-21R estimulado, principalmente por estimulación de células T CD8+, inmunidad innata y adaptativa *in vivo* contra células tumorales inmunogénicas y no inmunogénicas (Ejemplo 9). Los métodos también se basan, en parte, en el hallazgo de que IL-21 induce la proliferación de timocitos estimulados con anticuerpo antígeno o anti-CD3, células T de ganglio linfático, células T CD4+ o células T CD8+. Los solicitantes también muestran que la proliferación de células T a aloantígenos se puede aumentar en presencia de IL-21. Además, IL-21 puede también potenciar la proliferación y/o diferenciación de células T CD8+ (Ejemplo 10). Por ejemplo, el cebado de células T CD8+ en presencia de IL-21 puede generar células efectoras con actividad lítica mejorada (CTL) y/o capacidad incrementada para secretar citocinas, por ejemplo, IFNγ. IL-21- o un agente de unión a IL-21R que estimula la actividad de IL-21/IL-21R se puede usar para inducir la proliferación y/o secreción de citocinas de macrófagos. IL-21 también tiene efectos sobre células T de memoria y células presentadoras de antígeno (APC). También se ha descubierto que IL-21 se produce por células CD4+ activadas. De acuerdo con lo anterior, los agentes de unión que estimulan la vía de IL-21/IL-21R se pueden usar solos o en combinación con un antígeno, por ejemplo, como un adyuvante (por ejemplo, un adyuvante de vacuna), para inducir la expresión de una respuesta inmune *in vivo*, por ejemplo, para uso en el tratamiento de cáncer y trastornos infecciosos.

En una realización, los IL-21agonísticos/agonistas de IL-21R pueden ser útiles en el tratamiento de diversas deficiencias y trastornos inmunitarios (incluyendo la inmunodeficiencia combinada severa (SCID)), por ejemplo, en la regulación (hacia arriba o hacia abajo) del crecimiento y la proliferación de los linfocitos T y/o B, así como ocasionar la actividad citolítica de las células NK y otras poblaciones celulares. Estas deficiencias inmunitarias pueden ser genéticas o ser causadas por infecciones virales (por ejemplo, VIH), así como infecciones bacterianas o por hongos, o pueden ser resultado de trastornos autoinmunes. Más específicamente, las enfermedades infecciosas causadas por infecciones virales, bacterianas, fúngicas u otras pueden tratarse usando una proteína de la presente divulgación, incluyendo infecciones por VIH, virus de hepatitis, herpesvirus, micobacterias, *Leishmania* spp., *Malaria* spp. y diversas infecciones fúngicas tales como candidiasis. Por supuesto, a este respecto, una proteína de la presente divulgación también puede ser útil cuando un impulso al sistema inmune generalmente puede ser deseable, esto es, en el tratamiento del cáncer.

La expresión inducida de una función de antígeno (preferiblemente una función de antígeno de linfocitos B), como un medio para inducir la expresión de las respuestas inmunes, también puede ser útil en terapia. Para inducir la expresión de las respuestas inmunes puede estar en forma de potenciar una respuesta inmune existente o de provocar una respuesta inmune inicial. Por ejemplo, potenciar una respuesta inmune a través de la estimulación de

la función del antígeno de linfocitos B puede ser útil en casos de infección viral. Además, las enfermedades víricas sistémicas tales como la influenza, el resfriado común y la encefalitis se podrían aliviar mediante la administración sistémica de formas estimuladoras de antígenos de linfocitos B.

5 Alternativamente, las respuestas inmunes antivirales se pueden mejorar en un paciente infectado mediante la eliminación de células T del paciente, coestimulando las células T *in vitro* con APCs pulsadas con antígeno viral ya sea expresando un péptido de la presente divulgación o junto con una forma estimulante de un péptido soluble de la presente divulgación y reintroducir las células T activadas *in vitro* en el paciente. Otro método para potenciar las respuestas inmunes antivirales sería aislar células infectadas de un paciente, transfectarlas con un ácido nucleico que codifica una proteína de la presente divulgación como se describe en este documento, de modo que las células expresen toda o una porción de la proteína en su superficie, y reintroducir las células transfectadas en el paciente. Las células infectadas serían ahora capaces de suministrar una señal coestimuladora a, y así activar, células T *in vivo*.

10 En otra aplicación, el aumento o mejora de la función del antígeno puede ser útil en la inducción de la inmunidad tumoral. Las células tumorales (por ejemplo, sarcoma, melanoma, linfoma, leucemia, neuroblastoma, carcinoma) transfectadas con un ácido nucleico que codifica al menos un péptido de la presente divulgación se puede administrar a un sujeto para superar la tolerancia específica del tumor en el sujeto. Si se desea, la célula tumoral se puede transfectar para expresar una combinación de péptidos. Por ejemplo, las células tumorales obtenidas de un paciente se pueden transfectar *ex vivo* con un vector de expresión dirigiendo la expresión de un agonista de IL-21/IL-21R, solo o en combinación con un péptido que tiene sólo actividad de tipo B7-2 o en conjunto con un péptido que tiene actividad similar a B7-1 y/o actividad similar a B7-3. Las células tumorales transfectadas se devuelven al paciente para dar lugar a la expresión de los péptidos en la superficie de la célula transfectada. Alternativamente, se pueden usar técnicas de terapia génica para dirigir una célula tumoral para transfección *in vivo*.

15 La presencia de un agonista de IL-21/IL-21R, en combinación con un péptido que tiene la actividad de un antígeno(s) de linfocitos B en la superficie de la célula tumoral proporciona la señal de coestimulación necesaria a las células T para inducir una respuesta inmune mediada por células T contra las células tumorales transfectadas. Además, las células tumorales que carecen de moléculas MHC clase I o MHC clase II, o que no reexpresan cantidades suficientes de moléculas MHC de clase I o MHC de clase II, se pueden transfectar con ácido nucleico que codifica la totalidad o una porción de (por ejemplo, una parte truncada de dominio citoplásmico) de una clase de MHC alfa, una proteína de cadena y una proteína de microglobulina β_2 o una proteína de cadena α de MHC de clase 20 II y una proteína de cadena β de MHC de clase II para expresar de ese modo proteínas MHC clase I o MHC de clase II en la superficie celular. Expresión de MHC de clase I o de clase II apropiado junto con un agonista de IL-21/IL-21R, y/o un péptido que tiene la actividad de un antígeno de linfocito B (por ejemplo, B7-1, B7-2, B7-3) induce una respuesta inmune mediada por células T contra la célula tumoral transfectada. Opcionalmente, un gen que codifica una construcción antisentido que bloquea la expresión de una proteína asociada a MHC de clase II, tal como la cadena invariante, también se puede cotransfectar con un ADN que codifica un agonista de IL-21/IL-21R y/o un péptido que tiene la actividad de un antígeno de linfocitos B para promover la presentación de antígenos asociados a tumores e inducir inmunidad específica de tumor. De este modo, la inducción de una respuesta inmune mediada por células T en un sujeto humano puede ser suficiente para superar la tolerancia específica del tumor en el sujeto.

25 En otras realizaciones, los agonistas de IL-21/IL-21R se pueden usar como adyuvantes de vacuna. Los adyuvantes son compuestos moduladores de la inmunidad que tienen la capacidad de mejorar y/o dirigir el desarrollo y el perfil de las respuestas inmunes frente a diversos antígenos que son ellos mismos poco inmunogénicos. Las citocinas y/o linfoquinas se pueden usar como adyuvantes. La selección apropiada de adyuvantes puede inducir respuestas inmunes de buen humor y celulares que no se desarrollarían en ausencia de adyuvante. En particular, los adyuvantes tienen efectos significativos en el aumento de la respuesta inmune a antígenos de subunidad y péptido en vacunas. Su actividad estimuladora es también beneficiosa para el desarrollo de respuestas inmunes específicas antigénicas dirigidas contra antígenos proteínicos. Para una variedad de antígenos que requieren respuestas mucosales fuertes, títulos altos de suero, inducción de CTL y respuestas celulares vigorosas, adyuvantes y combinaciones de citocina/linfoquina proporcionan estímulos que no se proporcionan en la mayoría de las preparaciones de antígeno.

30 Como se usa en este documento, la expresión "adyuvante de vacuna" o "terapia de vacuna" pretende significar el uso de un agonista de IL-21/IL-21R, por ejemplo, un polipéptido o polinucleótido de IL-21 que codifica el mismo, en combinación con un antígeno (por ejemplo, polipéptidos virales, parasitarios y bacterianos, proteínas o péptidos), u otros antígenos (por ejemplo, polipéptidos de células de cáncer o tumorales, proteínas o péptidos) o polinucleótidos que codifican el antígeno para potenciar, suprimir o de otra manera modular una respuesta inmune al antígeno. A efectos de esta definición, se entenderá por "combinación" el uso junto con, simultáneo con (combinado o no combinado) o secuencialmente con un antígeno.

35 El término "composición de adyuvante de vacuna" se refiere a un adyuvante de vacuna que adicionalmente incluye diluyentes o portadores inmunológicamente aceptables de una manera convencional para preparar soluciones o suspensiones líquidas inyectables. La composición de adyuvante de vacuna puede incluir adicionalmente agentes que potencian adicionalmente una respuesta inmune provocada por IL-21. Por ejemplo, la composición de

adyuvante de vacuna puede incluir adicionalmente monofosforil 3-O-desacilado lípido A (MPL™) o monofosforil lípido A y derivados y análogos del mismo. MPL™ se puede usar en un intervalo de 1-100µg/dosis.

5 Los antígenos utilizados para la terapia de vacunación incluyen proteínas, péptidos o polipéptidos derivados de proteínas inmunogénicas y no inmunogénicas, así como cualquiera de los siguientes: sacáridos, proteínas, poli- u oligonucleótidos u otros componentes macromoleculares, o fragmentos de los mismos. Como se usa en esta sección, un "péptido" comprende una serie de al menos seis aminoácidos y contiene al menos un determinante antigénico, mientras que un "polipéptido" es una molécula más larga que un péptido, pero no constituye una proteína de longitud completa. Como se usa en este documento, un "fragmento" comprende una porción, pero menos que la totalidad de un sacárido, proteína, poli u oligonucleótido u otros componentes macromoleculares.

10 Como se usa en este documento, el término "cantidad de adyuvante eficaz" significa una dosis de la combinación de adyuvantes descritos en este documento, que es apropiada para provocar una respuesta inmune aumentada en un huésped vertebrado. La dosificación particular dependerá en parte de la edad, peso y estado médico del huésped, así como del método de administración y del antígeno.

15 La composición de adyuvante de vacuna de la divulgación se puede administrar a un vertebrado humano o no humano mediante una variedad de rutas, incluyendo, pero no limitándose a, intranasal, oral, vaginal, rectal, parenteral, intradérmica, transdérmica (véase, por ejemplo, la solicitud internacional WO 98/20734 (44), intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa e intraarterial. La cantidad del componente o componentes antigénicos de la composición antigénica variará dependiendo en parte de la identidad del antígeno, así como de la edad, peso y estado médico del huésped, así como del método de administración. Una vez más, las dosis apropiadas son fácilmente determinadas por los expertos en el arte. Es preferible, aunque no se requiere, que el antígeno y la combinación de adyuvantes se administren al mismo tiempo. El número de dosis y el régimen de dosificación para la composición antigénica también se determinan fácilmente por los expertos en el arte. En algunos casos, las propiedades adyuvantes de la combinación de adyuvantes pueden reducir el número de dosis necesarias o la duración del régimen de dosificación.

25 Las combinaciones de adyuvantes de esta divulgación son apropiadas para uso en combinación con una amplia variedad de antígenos de una amplia variedad de microorganismos patógenos, incluyendo, pero no limitando a virus, bacterias, hongos o microorganismos parasitarios que infectan seres humanos y vertebrados no humanos, o de una célula cancerígena o célula tumoral (por ejemplo, sarcoma, melanoma, linfoma, leucemia, neuroblastoma, carcinoma). El antígeno puede comprender péptidos o polipéptidos derivados de proteínas, así como fragmentos de cualquiera de los siguientes: sacáridos, proteínas, poli u oligonucleótidos, células cancerígenas o tumorales, alérgenos, proteína peptídica amiloide u otros componentes macromoleculares. En algunos casos, se incluye más de un antígeno en la composición antigénica.

35 Las vacunas víricas deseables que contienen las combinaciones de adyuvantes de esta divulgación incluyen aquellas dirigidas a la prevención y/o tratamiento de enfermedades causadas, sin limitación, por virus de inmunodeficiencia humana, virus de inmunodeficiencia de Simian, virus sincicial respiratorio, virus de parainfluenza de los tipos 1-3, Virus de la influenza, virus del herpes simple, citomegalovirus humano, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del papiloma humano, poliovirus, rotavirus, calicivirus, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la rubéola, adenovirus, virus de la rabia, virus del moquillo canino, virus de la peste bovina, coronavirus, parvovirus, virus de la rinotraqueitis infecciosa, virus de la leucemia felina, virus de la peritonitis infecciosa felina, virus de la enfermedad bursal infecciosa aviar, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la enfermedad de Marek, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, virus de la arteritis equina y diversos virus de la encefalitis. En una realización, los agonistas de IL-21/IL-21R se administran en combinación con un antagonista de TNF, por ejemplo, un antagonista de TNF como se describe en este documento, para tratar una infección por el virus de la hepatitis C

45 Las vacunas bacterianas deseables que contienen las combinaciones de adyuvantes de esta divulgación incluyen aquellas dirigidas a la prevención y/o tratamiento de enfermedades causadas, sin limitación, por *Haemophilus influenzae* (tanto tipificable como no tipificable), *Haemophilus somnus*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Bordetella pertussis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*- *Mycobacterium intracellulare* complex, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium tetani*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Mycoplasma gallisepticum*.

55 Las vacunas deseables contra patógenos fúngicos que contienen las combinaciones de adyuvantes de esta divulgación incluyen aquellas dirigidas a la prevención y/o tratamiento de enfermedades causadas, sin limitación, por *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Coccidioides*, *Cryptococcus* e *Histoplasma*.

Las vacunas deseables contra parásitos que contienen las combinaciones de adyuvantes de esta divulgación incluyen aquellas dirigidas a la prevención y/o tratamiento de enfermedades causadas, sin limitación, por *Leishmania*

major, Ascaris, Trichuris, Giardia, Schistosoma, Cryptosporidium, Trichomonas, Toxoplasma gondii y Pneumocystis carinii.

5 Las vacunas deseables para provocar un efecto anticancerígeno terapéutico o profiláctico en un huésped vertebrado, que contienen las combinaciones de adyuvantes de esta divulgación, incluyen aquellas que utilizan un antígeno de cáncer o antígeno asociado a tumor incluyendo, sin limitación, antígeno específico de próstata (PSA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), antígeno carcinoembrionario (CEA), MUC-1, Her2, CA-125, MAGE-3, EGFR, HELP, GCC, CD66-c, prostasina, TMPRSS3, TADG 12 y TADG 15.

10 Las vacunas deseables para moderar las respuestas a los alérgenos en un huésped vertebrado, que contienen las combinaciones de adyuvantes de esta divulgación incluyen las que contienen un alérgeno o fragmento de la misma. Ejemplos de tales alérgenos se describen en la Patente de los Estados Unidos Número 5,830,877 (45) y en la Solicitud de Patente Internacional Publicada Número WO 99/51259 (46), e incluyen polen, venenos de insectos, caspa de animales, esporas de hongos y fármacos (tales como penicilina). Las vacunas interfieren con la producción de anticuerpos IgE, una causa conocida de reacciones alérgicas.

15 Las vacunas deseables para prevenir o tratar enfermedades caracterizadas por deposición de amiloide en un huésped vertebrado, que contienen las combinaciones de adyuvantes de esta divulgación, incluyen aquellas que contienen porciones de proteína de péptido amiloide (APP). Esta enfermedad se denomina de manera diversa como enfermedad de Alzheimer, amiloidosis o enfermedad amiloidogénica. De este modo, las vacunas de esta divulgación incluyen las combinaciones adyuvantes de esta divulgación más el péptido A β , así como fragmentos de péptido A β y anticuerpos contra el péptido A β o fragmentos de los mismos.

20 En el caso de VIH y SIV, las composiciones antigénicas comprenden al menos una proteína, polipéptido, péptido o fragmento derivado de dicha proteína. En algunos casos, se incluyen múltiples proteínas, polipéptidos, péptidos y/o fragmentos de VIH o SIV en la composición antigénica.

25 Las formulaciones de combinación adyuvante de esta divulgación también son apropiadas para su inclusión como un adyuvante en vacunas de polinucleótidos (también conocidas como vacunas de ADN). Dichas vacunas pueden incluir además agentes facilitadores tales como bupivacaína (véase la Patente de los Estados Unidos Número 5,593,972 (49)).

Usos de los antagonistas de IL-21/IL-21R para disminuir la actividad de la célula inmune

30 En incluso otro aspecto, la divulgación presenta un método para inhibir la actividad de una célula inmune, por ejemplo, células T maduras (células T CD8+ maduras, células T CD4+ maduras), células NK maduras, células B, macrófagos y megacariocitos, o una población de los mismos, poniendo en contacto una población de células T con un antagonista de IL-21/IL-21R en una cantidad suficiente para inhibir la actividad de la célula o población inmune. También se pueden administrar antagonistas de IL-21 y/o IL-21R (por ejemplo, una proteína de fusión o un anticuerpo neutralizante, como se describe en este documento) a sujetos para los que se desea la inhibición de una respuesta inmune. Estas condiciones incluyen, por ejemplo, trastornos autoinmunes (por ejemplo, trastornos artríticos), o trasplante de órganos.

35 Los solicitantes han demostrado que una reducción de la actividad de IL-21R usando una proteína de fusión neutralizante que incluye el dominio extracelular de la IL-21R fusionada a una región de inmunoglobulina Fc mejora los síntomas inflamatorios en modelos animales de artritis inducida con colágeno (CIA) en ratón (Ejemplo 7). La expresión del ARNm de IL-21R se aumenta en las patas de ratones con CIA (Ejemplo 8). De acuerdo con lo anterior, se pueden usar agentes de unión a IL-21R que antagonizan la actividad de IL-21/IL-21R para inducir la supresión inmune *in vivo*, por ejemplo, para tratar o prevenir patologías asociadas con células inmunes, incluyendo rechazo de trasplantes y trastornos autoinmunes.

40 El ADN de IL-21R también se correlaciona con el locus cromosómico para la enfermedad de Crohn. Como resultado, los agentes de unión de la presente divulgación se pueden usar para tratar la enfermedad de Crohn y otras enfermedades inflamatorias intestinales.

45 El método en cuestión se puede usar también para modular (por ejemplo, inhibir) la actividad, por ejemplo, proliferación, diferenciación, supervivencia) de una célula inmune o hematopoyética (por ejemplo, una célula de linajes mieloides, linfoides, eritroides o células precursoras de los mismos), y, de este modo, se puede usar para tratar o prevenir una variedad de trastornos inmunes. Ejemplos no limitantes de los trastornos que se pueden tratar o prevenir incluyen, pero no se limitan a, rechazo de trasplante, enfermedades autoinmunes (incluyendo, por ejemplo, diabetes mellitus, artritis (incluyendo artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriásica), esclerosis múltiple, encefalomielitis, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmune, dermatitis (incluyendo dermatitis atópica y dermatitis eccematosa), psoriasis, síndrome de Sjögren, enfermedad de Crohn, úlcera aftosa, iritis, conjuntivitis, queratoconjuntivitis, colitis ulcerativa, espondiloartropatía, espondilitis anquilosante, asma intrínseca, asma alérgica, lupus eritematoso cutáneo, esclerodermia, vaginitis, proctitis, erupciones por fármacos, reacciones de reversión de la lepra, eritema nudoso leproso, uveítis autoinmune, encefalomielitis alérgica, encefalopatía hemorrágica necrotizante aguda, pérdida auditiva sensorineural bilateral progresiva idiopática,

- 5 anemia aplásica, anemia de glóbulos rojos puros, trombocitopenia idiopática, policondritis, granulomatosis de Wegener, hepatitis crónica activa, síndrome de Stevens-Johnson, esprue idiopático, liquen plano, enfermedad de Graves, sarcoidosis, cirrosis biliar primaria, uveítis posterior y fibrosis pulmonar intersticial), enfermedad de injerto contra huésped, y alergia tal como, alergia atópica. Los trastornos preferidos que pueden ser tratados usando los agentes de unión descritos y/o reivindicados en este documento
- 10 incluyen trastornos artríticos (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriásica y espondilitis anquilosante (preferiblemente artritis reumatoide)), esclerosis múltiple, diabetes tipo I, lupus (SLE), IBD, enfermedad de Crohn, asma, vasculitis, alergia, esclerodermia y psoriasis.
- 15 En otra realización, se pueden usar antagonistas de IL-21/IL-21R, solos o en combinación con otros agentes terapéuticos como se describe en este documento (por ejemplo, antagonistas de TNF) para tratar mieloma múltiple y neoplasias linfocíticas de linfocitos B relacionadas (Brenne, A. et al. (2002) Blood Vol. 99(10):3756-3762).
- 20 Usando los antagonistas de IL-21/IL-21R, es posible modular las respuestas inmunes, de varias maneras. La inhibición de la expresión puede estar en forma de inhibición o bloqueo de una respuesta inmune ya en curso o puede implicar la prevención de la inducción de una respuesta inmune. Las funciones de las células T activadas se puede inhibir suprimiendo respuestas de células T o induciendo tolerancia específica en células T, o ambas. La inmunosupresión de las respuestas de las células T es generalmente un procedimiento activo, específico de no antígenos, que requiere la exposición continua de las células T al agente de agotamiento. La tolerancia, que implica inducir falta de respuesta o anergia en las células T, se puede distinguir de la inmunosupresión en el sentido de que es generalmente específica del antígeno y persiste después de que ha cesado la exposición al agente tolerante.
- 25 Operacionalmente, la tolerancia se puede demostrar por la falta de una respuesta de células T tras la reexposición a un antígeno específico en ausencia del agente tolerante.
- 30 La inhibición de la expresión o prevención de una o más funciones antigénicas (incluyendo, sin limitación, las funciones del antígeno de linfocitos B, por ejemplo, la prevención de la síntesis de linfoquinas de alto nivel por células T activadas, será útil en situaciones de trasplante de tejido, piel y órgano y en enfermedad de injerto contra huésped (GVHD). Por ejemplo, el bloqueo de la función de las células T debe dar como resultado una reducción de la destrucción tisular en el trasplante de tejido. Por lo general, en los trasplantes de tejido, el rechazo del trasplante se inicia a través de su reconocimiento como extraño por las células T, seguido por una reacción inmune que destruye el trasplante. La administración de un antagonista de IL-21/IL-21R, en combinación con una molécula que inhibe o bloquea la interacción de un antígeno de linfocito B7 con su(s) ligando(s) natural(es) en células inmunes (tales como una forma monomérica, soluble de un péptido que tiene actividad B7-2 sola o en conjunción con una forma monomérica de un péptido que tiene una actividad de otro antígeno de linfocito B (por ejemplo, B7-1, B7-3) o anticuerpo de bloqueo), antes del trasplante puede conducir a la unión de la molécula al ligando(s) natural(es) sobre las células inmunes sin transmitir la señal coestimuladora correspondiente. El bloqueo de la función del antígeno de los linfocitos B en esta materia evita la síntesis de citocinas por las células inmunes, tales como las células T, y de este modo actúa como un inmunosupresor. Además, la falta de coestimulación puede ser también suficiente para energizar las células T, induciendo así tolerancia en un sujeto. La inducción de tolerancia a largo plazo por los reactivos de bloqueo del antígeno de linfocitos B puede evitar la necesidad de una administración repetida de estos reactivos de bloqueo. Para conseguir una inmunosupresión o tolerancia suficiente en un sujeto, también puede ser necesario bloquear la función de una combinación de antígenos de linfocitos B.
- 35 La eficacia de reactivos de bloqueo particulares en la prevención del rechazo de trasplante de órganos o GVHD se puede evaluar usando modelos animales que son predictivos de eficacia en seres humanos. Ejemplos de sistemas apropiados que se pueden usar incluyen injertos cardíacos alogénicos en ratas e injertos de células de islotes pancreáticos xenogénicos en ratones, los cuales se han usado para examinar los efectos inmunosupresores de las proteínas de fusión CTLA4Ig *in vivo* como se describe en Lenschow et al., Science 257:789-792 (1992) y Turka et al., Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 89:11102-11105 (1992). Además, se pueden usar modelos murinos de GVHD (véase Paul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 846-847) para determinar el efecto del bloqueo de la función del antígeno de linfocitos B *in vivo* sobre el desarrollo de esa enfermedad.
- 40 El bloqueo de la función del antígeno también puede ser terapéuticamente útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Muchos trastornos autoinmunes son el resultado de la activación inapropiada de células T que son reactivas contra el tejido propio y que promueven la producción de citocinas y autoanticuerpos implicados en la patología de las enfermedades. La prevención de la activación de las células T autorreactivas puede reducir o eliminar los síntomas de la enfermedad. La administración de antagonistas de IL-21/IL-21R en combinación con reactivos que bloquean la coestimulación de células T interrumpiendo interacciones receptor: ligando de antígenos de linfocitos B se puede utilizar para inhibir la activación de células T y prevenir la producción de autoanticuerpos o citocinas derivadas de células T, que pueden estar involucradas en el procedimiento de la enfermedad. Además, los antagonistas de IL-21/IL-21R en combinación con reactivos de bloqueo pueden inducir tolerancia específica a antígeno de células T autorreactivas que podrían conducir a un alivio a largo plazo de la enfermedad. La eficacia de estos agentes en la prevención o alivio de trastornos autoinmunes se puede determinar usando una serie de modelos animales bien caracterizados de enfermedades autoinmunes humanas. Los ejemplos incluyen encefalitis autoinmune experimental murina, lupus eritematoso sistémico en ratones MRL/lpr/lpr o ratones híbridos NZB, artritis
- 50
- 55
- 60

de colágeno autoinmune murina, diabetes mellitus en ratones NOD y ratas BB y miastenia gravis experimental murina (véase Paul ed., *Fundamental Immunology*, Raven Press, New York, 1989, pp. 840-856).

En una realización, los antagonistas de IL-21/IL-21R, por ejemplo, composiciones farmacéuticas de los mismos, se administran en terapia de combinación, esto es, combinados con otros agentes, por ejemplo, agentes terapéuticos, que son útiles para tratar afecciones o trastornos patológicos, tales como trastornos inmunitarios e inflamatorios. El término "en combinación" en este contexto significa que los agentes se dan sustancialmente simultáneamente, ya sea de forma simultánea o secuencialmente. Si se administra secuencialmente, al comienzo de la administración del segundo compuesto, el primero de los dos compuestos es preferiblemente todavía detectable a concentraciones efectivas en el sitio de tratamiento.

Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir uno o más antagonistas de IL-21/IL-21R, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humanizado, humano o generado *in vitro* o fragmento de unión a antígenos del mismo) contra el receptor de IL-21 o IL-21, una proteína de fusión de IL-21, un receptor soluble de IL-21, un inhibidor peptídico o un inhibidor de molécula pequeña) coformulados con, y/o coadministrados con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o más citocinas e inhibidores del factor de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, inhibidores metabólicos, inhibidores enzimáticos y/o agentes citotóxicos o citostáticos, como se describe con más detalle a continuación. Además, uno o más antagonistas de IL-21/IL-21R descritos en este documento se pueden usar en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos descritos en este documento. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosificaciones más bajas de los agentes terapéuticos administrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias. Además, los agentes terapéuticos descritos en este documento actúan sobre vías que difieren de la vía del receptor de IL-21/IL-21R, y de este modo se espera que aumenten y/o se sinergicen con los efectos de los antagonistas de IL-21/IL-21R.

Los agentes terapéuticos preferidos usados en combinación con un antagonista de IL-21/IL-21R son aquellos agentes que interfieren en diferentes etapas en la respuesta autoinmune y posterior inflamatoria. En una realización, uno o más antagonistas de IL-21/IL-21R descritos en este documento pueden ser coformulados con, y/o coadministrados con, uno o más agentes adicionales tales como otros citocinas o antagonistas del factor de crecimiento (por ejemplo, receptores solubles, inhibidores peptídicos, moléculas pequeñas, fusiones de ligandos); o anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a otros objetivos (por ejemplo, anticuerpos que se unen a otras citocinas o factores de crecimiento, sus receptores u otras moléculas de superficie celular); y citocinas antiinflamatorias o agonistas de las mismas. Ejemplos no limitantes de los agentes que se pueden usar en combinación con los antagonistas de IL-21/IL-21R descritos en este documento, incluyen, pero no se limitan a, antagonistas de una o más interleucinas (IL) o sus receptores, por ejemplo antagonistas de IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, y IL-22; antagonistas de citocinas o factores de crecimiento o sus receptores, tales como factor de necrosis tumoral (TNF), LT, EMAP-II, GM-CSF, FGF y PDGF. Los antagonistas de IL-21/IL-21R también se pueden combinar con inhibidores de, por ejemplo, anticuerpos contra moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, o sus ligandos, incluyendo CD154 (gp39 o CD40L), o LFA-1/ICAM-1 y VLA-4/VCAM-1 (Yusuf-Makagiansar H. et al. (2002) *Med Res Rev* 22(2):146-67). Los antagonistas preferidos que se pueden usar en combinación con antagonistas de IL-21/IL-21R descritos en este documento incluyen antagonistas de IL-1, IL-12, TNF α , IL-15, IL-17, IL-18, y IL-22.

Ejemplos de estos agentes incluyen antagonistas de IL-12, tales como anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o generados *in vitro* (o fragmentos de unión a antígenos de los mismos) que se unen a IL-12 (preferiblemente IL-12 humana), por ejemplo, el anticuerpo descrito en el documento WO 00/56772, Genetics Institute/BASF); inhibidores del receptor de IL-12, por ejemplo, anticuerpos contra el receptor de IL-12 humano; y fragmentos solubles del receptor de IL-12, por ejemplo, receptor de IL-12 humano. Ejemplos de antagonistas de IL-15 incluyen anticuerpos (o fragmentos de unión a antígenos del mismo) contra IL-15 o su receptor, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o generados *in vitro* a IL-15 humana o su receptor, fragmentos solubles de receptor de IL-15, y las proteínas de unión a IL-15. Ejemplos de antagonistas de IL-18 incluyen anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o generados *in vitro* (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos), a IL-18 humana, fragmentos solubles del receptor de IL-18 y proteínas de unión a IL-18 (IL-18BP, Mallet et al. (2001) *Circ. Res.* 28). Ejemplos de antagonistas de IL-1 incluyen inhibidores de la enzima de conversión de la interleucina-1 (ICE), tales como Vx740, antagonistas de IL-1, por ejemplo, IL-1RA (ANIKINRA, AMGEN), sIL1RII (Immunex), y anticuerpos del receptor anti-IL-1 (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos).

Ejemplos de antagonistas de TNF incluyen anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o generados *in vitro* (o fragmentos de unión a antígenos de los mismos) a TNF (por ejemplo, TNF α humano), tales como D2E7, (anticuerpo de TNF α humano, U.S. 6,258,562; BASF), CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNF α humanizado, Celltech/Farmacía), cA2 (anticuerpo anti-TNF α quimérico, RemicadeTM, Centocor); fragmentos de anticuerpo anti-TNF (por ejemplo, CPD870); fragmentos solubles de los receptores de TNF, por ejemplo, receptores de TNF humano p55 o p75 o derivados del mismo, por ejemplo, TNFR-IgG de 75 kd (proteína de fusión del receptor TNF-IgG de 75 kd, EnbrelTM, Immunex, véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.*

(1996) Vol. 44, 235A), TNFR-IgG de p55 kd proteína de fusión del receptor de TNF de 55 kd (Lenercept)); antagonistas de enzima, por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de TNFa (TACE) (por ejemplo, un derivado de ácido alfa-sulfonil hidroxámico, WO 01/55112, e inhibidor de TACE N-hidroxiformamida GW 3333, -005 o -022); y TNF-bp/s-TNFR (proteína soluble de unión a TNF, véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S284; *Amer. J. Physiol.-Heart and Circulatory Physiology* (1995) Vol. 268, pp. 37-42). Los antagonistas de TNF preferidos son fragmentos solubles de los receptores de TNF, por ejemplo, receptores de TNF humanos p55 o p75 o derivados de los mismos, por ejemplo, inhibidores de TNFR-IgG de 75 kd, e inhibidores de la enzima convertidora de TNFa (TACE).

En otras realizaciones, los agentes de unión de IL-21-/IL21R descritos en este documento se pueden administrar en combinación con uno o más de los siguientes: antagonistas de IL-13, por ejemplo, receptores de IL-13 solubles (sIL-13) y/o anticuerpos contra IL-13; antagonistas de IL-2, por ejemplo DAB 486-IL-2 y/o DAB 389-IL-2 (proteínas de fusión de IL-2, Seragen, véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1993) Vol. 36, 1223), y/o anticuerpos contra IL-2R, por ejemplo anti-Tac (anti-IL-2R humanizado, Protein Design Labs, *Cancer Res.* 1990 Mar 1;50(5):1495-502). Incluso otra combinación incluye antagonistas de IL-21 en combinación con inhibidores anti-CD4 no agotado (IDEC-CE9.1/SB 210396 (anticuerpo anti-CD4 primatizado no agotado, IDEC/SmithKline). Incluso otras combinaciones preferidas incluyen antagonistas de la vía coestimuladora CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2) incluyendo anticuerpos, receptores solubles o ligandos antagonistas, así como el ligando de glicoproteína de p-selectina (PSGL), citocinas antiinflamatorias, por ejemplo, IL-4 (DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; IL-10 recombinante DNAX/Schering); IL-13 y TGFh, y agonistas de los mismos (por ejemplo, anticuerpos agonistas).

En otras realizaciones, uno o más agentes de unión a IL-21-/IL21R se pueden coformular con, y/o coadministrar con, uno o más fármacos anti-inflamatorios, inmunosupresores, o inhibidores metabólicos o enzimáticos. Ejemplos no limitantes de los fármacos o inhibidores que se pueden usar en combinación con los antagonistas de IL-21 descritos en este documento, incluyen, pero no se limitan a, uno o más de: fármaco(s) antiinflamatorios no esteroideos (NSAID), por ejemplo, ibuprofeno, Tenidap (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S280)), naproxeno (véase, por ejemplo, *Neuro Report* (1996) Vol. 7, pp. 1209-1213), Meloxicam, Piroxicam, Diclofenaco e Indometacina; Sulfasalazina (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S281); corticosteroides tales como prednisolona; fármaco(s) antiinflamatorios supresores de citocinas (CSAID); inhibidores de la biosíntesis de nucleótidos, por ejemplo, inhibidores de la biosíntesis de purinas, antagonistas de folato (por ejemplo, metotrexato (ácido N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil]metilamino]benzoil]-L-glutámico); e inhibidores de la biosíntesis de pirimidina, por ejemplo, inhibidores de la dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH) (por ejemplo, leflunomida (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S131; *Inflammation Research* (1996) Vol. 45, pp. 103-107). Los agentes terapéuticos preferidos para uso en combinación con antagonistas de IL-21/IL-21R incluyen NSAID, CSAID, inhibidores de DHODH (por ejemplo, leflunomida) y antagonistas de folato (por ejemplo, metotrexato).

Ejemplos de inhibidores adicionales incluyen uno o más de: corticosteroides (inyección oral, inhalada y local); inmunosupresores, por ejemplo, ciclosporina, tacrolimus (FK-506); y los inhibidores de mTOR, por ejemplo, derivados de sirolimus (rapamicina) o rapamicina, por ejemplo, derivados de rapamicina solubles (por ejemplo, derivados de rapamicina de éster, por ejemplo, CCI-779 (Elit. L. (2002) *Current Opinion Investig. Drugs* 3(8):1249-53; Huang, S. et al. (2002) *Current Opinion Investig. Drugs* 3(2):295-304); agentes que interfieren con la señalización por citocinas proinflamatorias tales como TNFa o IL-1 (por ejemplo, inhibidores de IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP quinasa), inhibidores de COX2, por ejemplo, celecoxib y variantes de los mismos, MK-966, véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S81); inhibidores de la fosfodiesterasa, por ejemplo, R973401 (inhibidor de la fosfodiesterasa de tipo IV, véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S282)); inhibidores de fosfolipasa, por ejemplo, inhibidores de la fosfolipasa 2 citosólica (cPLA2) (por ejemplo, análogos de trifluorometilcetona (U.S. 6,350,892)); inhibidores del factor de crecimiento de las células endoteliales vasculares o del receptor del factor de crecimiento, por ejemplo, inhibidor de VEGF y/o inhibidor de VEGF-R; e inhibidores de la angiogénesis. Los agentes terapéuticos preferidos para uso en combinación con inmunosupresores antagonistas de IL-21/IL-21R, por ejemplo, ciclosporina, tacrolimus (FK-506); e inhibidores mTOR, por ejemplo, sirolimus (rapamicina) o derivados de rapamicina, por ejemplo, derivados solubles de rapamicina (por ejemplo, derivados éster de rapamicina, por ejemplo, CCI-779; inhibidores de COX2, por ejemplo, celecoxib y variantes del mismo; e inhibidores de fosfolipasa, por ejemplo, inhibidores de fosfolipasa citosólica 2 (cPLA2) (por ejemplo, análogos de trifluorometilcetona)

Ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que se pueden combinar con un antagonista de IL-21/IL-21R incluyen uno o más de: 6-mercaptopurinas (6-MP); azatioprina sulfasalazina; mesalazina; olsalazina cloroquinina/hidroxicloroquina; pencilamina; aurotiomalato (intramuscular y oral); zatioprina; cochicina; agonistas adrenergicos beta-2 (salbutamol, terbutalina, salmeteral); xantinas (teofilina, arninofilina); cromoglicato; nedocromil; Ketotifeno; ipratropio y oxitropio; micofenolato mofetilo; agonistas de adenosina; agentes antitrombóticos; inhibidores del complemento; y agentes adrenérgicos.

El uso de los agentes de unión de IL-21-/IL21R descritos en este documento en combinación con otros agentes terapéuticos para tratar o prevenir trastornos inmunes específicos se discute con más detalle a continuación.

5 Ejemplos no limitantes de agentes para tratar o prevenir trastornos artríticos (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis inflamatoria, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis y artritis psoriásica), con los que se puede combinar un agente de unión a IL-21/IL21R incluyen uno o más de los siguientes: antagonistas de IL-12 como se describe en este documento, NSAID; CSAID; TNF, por ejemplo, TNFa, antagonistas como se describe en este documento; anticuerpos anti-CD4 no agotado como se describe en este documento; antagonistas de IL-2 como se describe en este documento; citocinas antiinflamatorias, por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-13 y TGFa, o agonistas de las mismas; antagonistas del receptor de IL-1 o IL-1 como se describe en este documento); inhibidores de fosfodiesterasa como se describe en este documento; inhibidores de COX-2 como se describe en este documento; iloprost (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S82); metotrexato; talidomida (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S282) y fármacos relacionados con la talidomida (por ejemplo, Celgen); leflunomida; inhibidor de la activación del plasminógeno, por ejemplo, ácido tranexámico; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S284); inhibidor de citocina, por ejemplo, T-614; véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S282); prostaglandina E1 (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S282); azatioprina (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S281); un inhibidor de la enzima de conversión de la interleucina-1 (ICE); zap-70 y/o inhibidor de lck (inhibidor de la tirosina quinasa zap-70 o lck); un inhibidor del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares o receptor del factor de crecimiento de células endoteliales vasculares como se describe en este documento; un inhibidor de la angiogénesis como se describe en este documento; fármacos antiinflamatorios corticosteroides (por ejemplo, SB203580); inhibidores de TNF convertasa; interleucina-11 (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S296); interleucina-13 (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S308); inhibidores de la interleucina-17 (véase, por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S120); oro; penicilamina; cloroquina; hidroxicloroquina; clorambucil; ciclofosfamida; ciclosporina; irradiación linfóide total; globulina antitímocito; toxinas CD5; péptidos administrados por vía oral y colágeno; lobenzarit disódico; agentes reguladores de citocinas (CRA) HP228 y HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); oligodesoxinucleótidos de fosforotioato antisentido ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor de complemento soluble 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednisona; orgoteína; polisulfato de glicosaminoglicano; minociclina; anticuerpos anti-IL2R; lípidos marinos y botánicos (ácidos grasos de semillas de peces y plantas, véase, por ejemplo, DeLuca et al. (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21:759-777); auranofina; fenilbutazona; ácido meclofenámico; ácido flufenámico; inmunoglobulina intravenosa; zileuton; ácido micofenólico (RS-61443); tacrolimus (FK-506); Sirolimus (rapamicina); amiprilosa (terafectina); cladribina (2-clorodesoxiadenosina); y azaribina. Las combinaciones preferidas incluyen uno o más antagonistas de IL-21 en combinación con metotrexato o leflunomida, y en casos de artritis reumatoide moderada o grave, ciclosporina.

35 Los ejemplos preferidos de inhibidores para usar en combinación con UL-21/IL-21R para tratar trastornos artríticos incluyen antagonistas de TNF (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o generados *in vitro*, o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, que se unen a TNF, fragmentos solubles de un receptor de TNF, por ejemplo, receptor de TNF humano p55 o p75 o derivados del mismo, por ejemplo, TNFR-IgG de 75 kd (proteína de fusión del receptor de TNF de 75 kd, Enbrel™), proteína de fusión del receptor de TNF de p55 kd; antagonistas de la enzima TNF, por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de TNFa (TACE)); antagonistas de IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-22; agentes supresores de células T y células B (por ejemplo, anticuerpos anti-CD4 o anti-CD22); inhibidores de molécula pequeña, por ejemplo, metotrexato y leflunomida; sirolimus (rapamicina) y análogos del mismo, por ejemplo, CCI-779; inhibidores de Cox-2 y cPLA2; NSAID; inhibidores de p38, inhibidores de TPL-2, Mk-2 y NFkb; RAGE o RAGE soluble; inhibidores de P-selectina o inhibidores de PSGL-1 (por ejemplo, inhibidores de moléculas pequeñas, anticuerpos contra los mismos, por ejemplo, anticuerpos contra P-selectina); agonistas de receptores de estrógeno beta (ERB) o antagonistas de ERBNFkb. Los agentes terapéuticos adicionales más preferidos que pueden ser coadministrados y/o coformulados con uno o más antagonistas de IL-21/IL-21R incluyen uno o más de: un fragmento soluble de un receptor de TNF, por ejemplo, receptor de TNF humano p55 o p75 o derivados del mismo, por ejemplo, TNFR-IgG de 75 kd (proteína de fusión del receptor de TNF de 75 kd, Enbrel™); metotrexato, leflunomida, o un sirolimus (rapamicina) o un análogo del mismo, por ejemplo, CCI-779.

50 Ejemplos no limitantes de agentes para tratar o prevenir la esclerosis múltiple con los que se puede combinar un agente de unión a IL-21-/IL21R incluyen los siguientes: interferones, por ejemplo, interferón alfa la (por ejemplo, Avonex™; Biogen) e interferón-1b (Betaseron™; Chiron/Berlex); copolímero 1 (Cop-1, Copaxone™, Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; cladribina; antagonistas de TNF como se describe en este documento; corticosteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; y tizanidina. Los antagonistas adicionales que se pueden usar en combinación con IL-21 incluyen anticuerpos o antagonistas de otras citocinas humanas o factores de crecimiento, por ejemplo, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-11, GMCSF, FGF, y PDGF. Los antagonistas de IL-21 como se describe en este documento se pueden combinar con anticuerpos para moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o sus ligandos. Los antagonistas de IL-21 se pueden combinar también con agentes tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato de mofetilo, leflunomida, NSAID, por ejemplo, ibuprofeno, corticosteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por citocinas proinflamatorias como se describe en este documento, inhibidores de la enzima convertidora de IL-1b (por

ejemplo, Vx740), anti-P7s, PSGL, inhibidores de TACE, inhibidores de señalización de células T tales como inhibidores de quinasas, inhibidores de metaloproteinasas, sulfasalazina, azatoprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, receptores de citocina solubles y derivados de los mismos, como se describe en este documento, y citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-13 y TGF).

- 5 Ejemplos preferidos de agentes terapéuticos para la esclerosis múltiple con los que se pueden combinar los antagonistas de IL-21 incluyen interferón- β , por ejemplo, IFN β -1a e IFN β -1b; copaxona, corticosteroides, inhibidores de IL-1, inhibidores de TNF, anticuerpos contra el ligando CD40 y CD80, antagonistas de IL-12.

10 Ejemplos no limitantes de agentes para tratar o prevenir la enfermedad inflamatoria intestinal o la enfermedad de Crohn con la que se puede combinar un antagonista de IL-21/IL-21R incluyen los siguientes: budenosida; factor de crecimiento epidérmico; corticosteroides; ciclosporina, sulfasalazina; aminosalicilatos; 6-mercaptopurina; azatioprina; metronidazol; inhibidores de lipoxigenasa; mesalamina; olsalazina; balsalazida; antioxidantes; inhibidores de tromboxano; antagonistas del receptor de IL-1; anticuerpos monoclonales anti-IL-1; anticuerpos monoclonales anti-IL-6; factores de crecimiento; inhibidores de la elastasa; compuestos de piridinil-imidazol; antagonistas de TNF como se describe en este documento; IL-4, IL-10, IL-13 y/o citocinas de TGF β o agonistas de las mismas (por ejemplo, anticuerpos agonistas); interleucina-11; profármacos conjugados con glucurónido o dextrano de prednisolona, dexametasona o budenosida; oligodesoxinucleótidos de fosforioato antisentido ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor del complemento soluble 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); mesalazina de liberación lenta; metotrexato; antagonistas del factor activador de plaquetas (PAF); ciprofloxacina; y lignocaina.

20 En una realización, se pueden usar antagonistas de IL-21/IL21R en combinación con uno o más anticuerpos dirigidos a otras dianas implicadas en la regulación de respuestas inmunes, por ejemplo, rechazo de trasplante o enfermedad de injerto contra huésped. Ejemplos no limitantes de agentes para tratar o prevenir respuestas inmunes con las que se puede combinar un antagonista de IL-21/IL21R descrito y/o reivindicado en este documento incluyen los siguientes: anticuerpos contra moléculas de superficie celular, incluyendo, pero sin limitarse a CD25 (receptor-a de interleucina-2), CD11 a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4, CD80 (B7-1) y/o CD86 (B7-2). En incluso otra realización, se usa un antagonista de IL-21/IL21R en combinación con uno o más agentes inmunosupresores generales, tales como ciclosporina A o FK506.

25 Otro aspecto de la presente divulgación se refiere, de acuerdo con lo anterior, a kits para llevar a cabo la administración combinada de los antagonistas de IL-21/IL21R con otros compuestos terapéuticos. En una realización, el kit comprende uno o más agentes de unión formulados en un portador farmacéutico, y al menos un agente, por ejemplo, un agente terapéutico, formulado según sea apropiado, en una o más preparaciones farmacéuticas separadas.

30 Ensayos para medir la actividad de los agonistas de IL-21/IL21R como activadores inmunes

La actividad de los agonistas de IL-21/IL21R como activadores de un sistema inmune se puede medir, entre otros medios, mediante los siguientes métodos:

35 Los ensayos apropiados para la citotoxicidad de timocitos o esplenocitos incluyen, sin limitación, los descritos en: Current Protocols in Immunology, Ed de J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Herrmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:2488-2492, 1981; Herrmann et al., J. Immunol. 128:1968-1974, 1982; Handa et al., J. Immunol. 135:1564-1572, 1985; Takai et al., J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai et al., J. Immunol. 140:508-512, 1988; Herrmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:2488-2492, 1981; Herrmann et al., J. Immunol. 128:1968-1974, 1982; Handa et al., J. Immunol. 135:1564-1572, 1985; Takai et al., J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Bowman et al., J. Virology 61:1992-1998; Takai et al., J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bertagnolli et al., Cellular Immunology 133:327-341, 1991; Brown et al., J. Immunol. 153:3079-3092, 1994.

45 Los ensayos para las respuestas de inmunoglobulinas dependientes de células T y la conmutación de isotipos (que identificarán, entre otras, proteínas que modulan respuestas de anticuerpos dependientes de células T y que afectan a los perfiles Th1/Th2) incluyen, sin limitación, los descritos en: Maliszewski, J. Immunol. 144:3028-3033, 1990; y Ensayos para la función de células B: Producción *in vitro* de anticuerpos, Mond, J. J. and Brunswick, M. En Current Protocols in Immunology. J. E.e.a. Coligan eds. Vol. 1 pp. 3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

50 Los ensayos de reacción de linfocitos mixtos (MLR) (que identificarán, entre otras, proteínas que generan predominantemente respuestas Th1 y CTL) incluyen, sin limitación, los descritos en: Current Protocols in Immunology, Ed de J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Takai et al., J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai et al., J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bertagnolli et al., J. Immunol. 149:3778-3783, 1992.

55 Los ensayos dependientes de células dendríticas (que identificarán, entre otras, las proteínas expresadas por células dendríticas que activan células T naïve) incluyen, sin limitación, los descritos en: Guery et al., J. Immunol.

- 134:536-544, 1995; Inaba et al., *Journal of Experimental Medicine* 173:549-559, 1991; Macatonia et al., *Journal of Immunology* 154:5071-5079, 1995; Porgador et al., *Journal of Experimental Medicine* 182:255-260, 1995; Nair et al., *Journal of Virology* 67:4062-4069, 1993; Huang et al., *Science* 264:961-965, 1994; Macatonia et al., *Journal of Experimental Medicine* 169:1255-1264, 1989; Bhardwaj et al., *Journal of Clinical Investigation* 94:797-807, 1994; e
- 5 Inaba et al., *Journal of Experimental Medicine* 172:631-640, 1990.
- Los ensayos para la supervivencia/apoptosis de linfocitos (que identificarán, entre otras, proteínas que previenen la apoptosis después de la inducción de superantígenos y proteínas que regulan la homeostasis de linfocitos) incluyen, sin limitación, los descritos en: Darzynkiewicz et al., *Cytometry* 13:795-808, 1992; Gorczyca et al., *Leukemia* 7:659-670, 1993; Gorczyca et al., *Cancer Research* 53:1945-1951, 1993; Itoh et al., *Cell* 66:233-243, 1991; Zacharchuk,
- 10 *Journal of Immunology* 145:4037-4045, 1990; Zamai et al., *Cytometry* 14:891-897, 1993; Gorczyca et al., *International Journal of Oncology* 1:639-648, 1992.
- Los ensayos para proteínas que influyen en etapas tempranas de compromiso y desarrollo de células T incluyen, sin limitación, los descritos en Antica et al., *Blood* 84:111-117, 1994; Fine et al., *Cellular Immunology* 155:111-122, 1994; Galy et al., *Blood* 85:2770-2778, 1995; Toki et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 88:7548-7551, 1991.
- 15 Ensayos para medir la actividad de los agonistas o antagonistas de IL-21/IL21R como moduladores de la producción de citoquinas y proliferación/diferenciación celular
- La actividad de los agonistas o antagonistas de IL-21/IL21R como modulador de la producción de citocinas y la proliferación/diferenciación celular se puede ensayar usando cualquiera de una serie de ensayos de proliferación celular dependientes de factor de rutina para líneas celulares incluyendo, sin limitación, 32D, DA2, DA1G, T10, B9,
- 20 B9/11, BaF3, MC9/G, M+(preB M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e y CMK.
- Los ensayos para la proliferación de células T o timocitos incluyen sin limitación los descritos en: *Current Protocols in Immunology*, Ed de J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, *In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function* 3.1-3.19; Chapter 7, *Immunologic studies in Humans*); Takai et al., *J. Immunol.* 137:3494-3500, 1986; Bertagnolli et al., *J. Immunol.* 145:1706-1712, 1990; Bertagnolli et al., *Cellular Immunology* 133:327-341, 1991; Bertagnolli, et al., *J. Immunol.* 149:3778-3783, 1992; Bowman et al., *J. Immunol.* 152: 1756-1761, 1994.
- 25 Los ensayos para la producción y/o proliferación de citocinas de células de bazo, células de ganglios linfáticos o timocitos incluyen, sin limitación, los descritos en: *Polyclonal T cell stimulation*, Kruisbeek, A. M. and Shevach, E. M. In *Current Protocols in Immunology*. J. E.e.a. Coligan eds. Vol 1 pp. 3.12.1-3.12.14, John Wiley and Sons, Toronto. 1994; and *Measurement of mouse and human Interferon.gamma.*, Schreiber, R. D. In *Current Protocols in Immunology*. J. E.e.a. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.8.1-6.8.8, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.
- 30 Los ensayos para la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas y linfopoyéticas incluyen, sin limitación, los descritos en: *Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4*, Bottomly, K., Davis, L. S. and Lipsky, P. E. In *Current Protocols in Immunology*. J. E.e.a. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.3.1-6.3.12, John Wiley and Sons, Toronto. 1991; deVries et al., *J. Exp. Med.* 173:1205-1211, 1991; Moreau et al., *Nature* 336:690-692, 1988; Greenberger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2931-2938, 1983; *Measurement of mouse and human interleukin 6--Nordan, R.* In *Current Protocols in Immunology*. J. E.e.a. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.6.1-6.6.5, John Wiley and Sons, Toronto. 1991; Smith et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:1857-1861, 1986; *Measurement of human Interleukin 11--Bennett, F., Giannotti, J., Clark, S. C. and Turner, K. J.* In *Current Protocols in Immunology*. J. E.e.a. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.15.1 John Wiley and Sons, Toronto. 1991; *Measurement of mouse and human Interleukin 9-Ciarletta, A., Giannotti, J., Clark, S. C. and Turner, K. J.* In *Current Protocols in Immunology*. J. E.e.a. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.13.1, John Wiley and Sons, Toronto. 1991.
- 35 Los ensayos para respuestas de clones de células T a antígenos (que identificarán, entre otras, proteínas que afectan las interacciones de células APC-T así como los efectos directos de células T midiendo la proliferación y la producción de citocinas) incluyen, sin limitación, los descritos en: *Current Protocols in Immunology*, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, *In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function*; Chapter 6, *Cytokines and their cellular receptors*; Chapter 7, *Immunologic studies in Humans*); Weinberger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:6091-6095, 1980; Weinberger et al., *Eur. J. Immun.* 11:405-411, 1981; Takai et al., *J. Immunol.* 137:3494-3500, 1986;
- 40 Takai et al., *J. Immunol.* 140:508-512, 1988.
- 45 Ensayos para medir, la actividad de los agonistas o antagonistas de IL-21/IL21R como reguladores de la hematopoyesis
- Los agonistas o antagonistas de IL-21/IL21R pueden ser útiles en la regulación de la hematopoyesis y, en consecuencia, en el tratamiento de las deficiencias de células mieloideas o linfoides. Incluso la actividad biológica
- 55 marginal en apoyo de células formadoras de colonias o de líneas celulares dependientes de factor indica la implicación en la regulación de la hematopoyesis, por ejemplo, al apoyar el crecimiento y la proliferación de células progenitoras eritroides solas o en combinación con otras citocinas, indicando así la utilidad, por ejemplo, en el

5 tratamiento de diversas anemias o para uso junto con la irradiación/quimioterapia para estimular la producción de
 precursores eritroides y/o células eritroides; al apoyar el crecimiento y la proliferación de células mieloides tales
 como granulocitos y monocitos/macrófagos (esto es, actividad tradicional de CSF) útiles, por ejemplo, en
 combinación con quimioterapia para prevenir o tratar la consiguiente mielosupresión; al apoyar el crecimiento y la
 10 proliferación de megacariocitos y, por consiguiente, de plaquetas, permitiendo así la prevención o el tratamiento de
 diversos trastornos plaquetarios tales como trombocitopenia, y generalmente para uso en lugar de o complementario
 a transfusiones de plaquetas; y/o en el apoyo al crecimiento y proliferación de células madre hematopoyéticas que
 son capaces de madurar a cualquiera y todas las células hematopoyéticas mencionadas anteriormente y por lo tanto
 encuentran utilidad terapéutica en diversos trastornos de células madre (tales como los usualmente tratados con
 15 trasplante, incluyendo, sin limitación, anemia aplásica y hemoglobinuria paroxística nocturna), así como en la
 repoblación del compartimento de células madre después de la irradiación/quimioterapia, ya sea *in vivo* o *ex vivo*
 (esto es, junto con trasplante de médula ósea o trasplante de células progenitoras periféricas (homólogos o
 heterólogos) como células normales o manipuladas genéticamente para terapia génica.

15 La actividad de los agentes de unión de IL-21 o IL-21R se pueden medir, entre otros medios, mediante los siguientes
 métodos:

Los ensayos apropiados para la proliferación y diferenciación de diversas líneas hematopoyéticas se citan
 anteriormente.

20 Los ensayos para la diferenciación de células madre embrionarias (que identificarán, entre otras, proteínas que
 influyen en la hematopoyesis de diferenciación embrionaria) incluyen, sin limitación, los descritos en: Johansson et
 al. *Cellular Biology* 15:141-151, 1995; Keller et al., *Molecular and Cellular Biology* 13:473-486, 1993; McClanahan et
 al., *Blood* 81:2903-2915, 1993.

25 Los ensayos para la supervivencia y diferenciación de células madre (que identificarán, entre otras, proteínas que
 regulan la linfohematopoyesis) incluyen, sin limitación, los descritos en: Methylcellulose colony forming assays,
 Freshney, M.G. In *Culture of Hematopoietic Cells*. R. I. Freshney, et al. eds. Vol pp. 265-268, Wiley-Liss, Inc., New
 York, N.Y. 1994; Hirayama et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:5907-5911, 1992; Primitive hematopoietic colony
 forming cells with high proliferative potential, McNiece, I. K. and Briddell, R. A. In *Culture of Hematopoietic Cells*. R. I.
 Freshney, et al. eds. Vol pp. 23-39, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. 1994; Neben et al., *Experimental Hematology*
 22:353-359, 1994; Cobblestone area forming cell assay, Ploemacher, R. E. In *Culture of Hematopoietic Cells*. R. I.
 Freshney, et al. eds. Vol pp. 1-21, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. 1994; Long term bone marrow cultures in the
 30 presence of stromal cells, Spooncer, E., Dexter, M. and Allen, T. In *Culture of Hematopoietic Cells*. R. I. Freshney, et
 al. eds. Vol pp. 163-179, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. 1994; Long term culture initiating cell assay, Sutherland, H.
 J. In *Culture of Hematopoietic Cells*. R. I. Freshney, et al. eds. Vol pp. 139-162, Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y.
 1994.

La divulgación se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

35 Ejemplo 1: Aislamiento y caracterización de ADNc de Mu-1 murina:

Se aisló un fragmento parcial del homólogo murino del receptor Mu-1 por PCR usando oligonucleótidos derivados de
 las secuencias humanas. El ADNc se preparó a partir de ARN aislado a partir de timo murino de 17 días de edad y
 de la línea de células T 2D6 murina. Se amplificó un fragmento de ADN de aproximadamente 300 nucleótidos a
 40 partir del ADNc por PCR con los siguientes oligonucleótidos, correspondientes a las regiones 584-603 y 876-896,
 respectivamente, de la secuencia de ADNc humano en la FIG. 1 (correspondiente a SEQ ID NO: 1):

AGCATCAAG CCGGCTCCCC (5p) (SEQ ID NO:11)

CTCCATTCAC TCCAGGTCCC (3p) (SEQ ID NO:12)

45 La amplificación se llevó a cabo usando Taq polimerasa en solución reguladora Taq 1X que contenía 1.5 mM de
 cloruro de magnesio durante 30 ciclos a 94°C durante un minuto, 50°C durante 1 minuto y 72°C durante un minuto.
 Se determinó la secuencia de ADN de este fragmento, y dos oligonucleótidos se derivaron de una porción interna de
 este fragmento con las siguientes secuencias:

TTGAACGTGACTGTGGCCTT (5P) (SEQ ID NO:13)

TGAATGAAGTGCCTGGCTGA (3P) (SEQ ID NO:14)

50 Los oligonucleótidos se usaron para amplificar un fragmento interno de 262 nucleótidos del producto original de PCR
 (correspondiente a los nucleótidos 781-1043 de la secuencia de ADNc de murino de la figura 1, y SEQ ID NO: 9)
 para usar como una sonda de hibridación para seleccionar una biblioteca de ADNc aislada de la línea de células T
 2D6T. Los filtros se hibridaron a 65°C usando condiciones de hibridación SSC 5X estándar y se lavaron en SSC a 65
 °C. Se hibridaron veinte clones a la sonda en un filtro de 426,000 clones. La secuencia de ADN se determinó a partir
 de dos clones independientes. La secuencia de longitud completa del clon #6 confirmó que era el homólogo murino
 55 de longitud completa de MU-1 humana (SEQ ID NO: 9).

La secuencia de nucleótidos de longitud completa de MU-1 murina se muestra en la figura 1 (correspondiente a SEQ ID NO: 9). La secuencia de nucleótidos tiene una secuencia líder pronosticada en los nucleótidos 407-464, secuencia codificante en 407-1993, y un codón de terminación en los nucleótidos 1994-1997. Los nucleótidos 1-406 corresponden a la región 5' no traducida y los nucleótidos 1998-2868 corresponden a la región 3' no traducida.

- 5 La secuencia de proteína pronosticada de MU-1 murina se muestra en la figura 2 (correspondiente a SEQ ID NO:10). Esta proteína MU-1 murina contiene una secuencia líder pronosticada determinada por SPScan (puntuación=10.1) (correspondiente a los aminoácidos 1-19 de SEQ ID NO:10) y un dominio transmembrana pronosticado (correspondiente a los aminoácidos 237-253 de SQ ID NO: 10). Los motivos de señalización pronosticados incluyen las siguientes regiones: Caja 1: aminoácidos 265-274 de SEQ ID NO:10, Caja 2: aminoácidos 310-324 de SEQ ID NO:10, seis residuos de tirosina en las posiciones 281, 319, 361, 297, Y 510 de SEQ ID NO:10. Los sitios potenciales de acoplamiento de STAT incluyen: STAT5, EDDGYPA (SEQ ID NO: 20), STAT3, YLQR.

- 10 Los oligonucleótidos se usaron para amplificar un fragmento interno de 262 nucleótidos del producto original de PCR (correspondiente a los nucleótidos 781-1043 de la secuencia de ADNc murino de la figura 1 y SEQ ID NO:9) para usar como sonda de hibridación para seleccionar una biblioteca de ADNc aislada de la línea de células T 2D6. Los filtros se hibridaron a 65°C usando condiciones de hibridación SSC 5X estándar y se lavaron en SSC a 65°C. Se aislaron 20 clones que se hibridaron con la sonda en un filtro de 426,000 clones. La secuencia de ADN se determinó a partir de dos clones independientes. La secuencia de longitud completa del clon # 6 confirmó que era el homólogo murino de longitud completa de MU-1 humana (SEQ ID NO: 9).

- 15 La secuencia de nucleótidos de longitud completa de MU-1 murina se muestra en la figura 1 (correspondiente a SEQ ID NO: 9). La secuencia de nucleótidos tiene una secuencia líder pronosticada en los nucleótidos 407-464, secuencia codificante en los nucleótidos 407-1993, codón de terminación en los nucleótidos 1994-1997. Los nucleótidos 1-406 corresponden a la región 5' no traducida y los nucleótidos 1998-2628 corresponden a la región 3' no traducida.

- 20 La secuencia de proteínas pronosticada de MU-1 murina se muestra en la figura 2 (correspondiente a la SEQ ID NO:10). Esta proteína MU-1 murina contiene una secuencia líder pronosticada determinada por SPScan (puntuación=10.1) (correspondiente a los aminoácidos 1-19 de SEQ ID NO:10), y un dominio transmembrana pronosticado (correspondiente a los aminoácidos 237-253 de SEQ ID NO:10). Los motivos de señalización pronosticados incluyen las siguientes regiones: Caja 1: aminoácidos 265-274 de SEQ ID NO:10, Caja 2: aminoácidos 310-324 de SEQ ID NO:10, seis residuos de tirosina en las posiciones 281, 319, 361, 368, 397 y 510 de SEQ ID NO:10. Los sitios potenciales de acoplamiento STAT incluyen: STAT5: EDDGYPA (SEQ ID NO: 20); STAT 3: YLQR.

Ejemplo 2: Comparación de MU-1 humana y murina:

- 35 El algoritmo GAP se usó para comparar los aminoácidos de MU-1 humana y murina. En la figura 4 se muestra una comparación de las secuencias de proteínas pronosticadas murinas y humanas. Los aminoácidos eran 65,267% idénticos usando el algoritmo GAP. La alineación se generó por matriz de sustitución de aminoácidos BLOSUM62 (Henikoff, S. and Henikoff, J. G. (1992)). Matrices de sustitución de aminoácidos a partir de bloques de proteínas (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919). Parámetros de brecha = Peso de brecha: 8, Apareamiento promedio=2,9 12, Peso de longitud = 2, Apareamiento erróneo promedio = -2.003. Porcentaje de similitud = 69.466.

- 40 Una comparación de las secuencias de nucleótidos de ADNc humano y murino se muestra en la figura 3. Las secuencias de ADN son idénticas al 66.116% cuando se alinean usando el algoritmo GAP. Parámetros de brecha: Peso de brecha = 50, Apareamiento promedio 10.000, Peso de longitud = 3, Apareamiento erróneo promedio = 0.000. Porcentaje de similitud = 66.198.

- 45 Tanto las proteínas MU-1 humanas como las de ratón son miembros de la superfamilia de receptores de citocinas de Tipo 1. La evaluación de la secuencia de ambas MU-1 murina y humana revela la presencia de potenciales motivos de señalización Box-i y Box-2. Seis residuos de tirosina están presentes en el dominio citoplásmico, y también podrían ser importantes en las funciones de señalización de MU-1. La comparación de las secuencias de MU-1 con otros miembros de la familia sugirió la presencia de potenciales sitios de acoplamiento para STAT 5 y STAT 3.

Ejemplo 3: Determinación de las vías de señalización STAT utilizadas por MU-1 humana:

- 50 Se diseñaron células BAF-3 para expresar un receptor de citocinas quiméricas que consistían en el dominio extracelular del receptor de EPO humano y el dominio intracelular del receptor MU-1. Las células BAF-3 que expresaban los receptores quiméricos de huEPORJMU-1 (cyto) proliferaron en respuesta a la EPO soluble humana. Estas células se analizaron para determinar qué moléculas STAT fueron fosforiladas en respuesta a la señalización de EPO. En resumen, el control de las células BAF-3 parentales no modificadas y las células BAF-3 quiméricas EPOR/MU se dejaron en reposo de medio de crecimiento que contenía IL-3 y se volvieron a estimular con ya sea IL-3 o EPO durante 0, 15, 30 y 60 minutos. Las células se sedimentaron y se volvieron a suspender en solución reguladora de lisis congelada que contenía ortovanadato, para conservar las tirosinas fosforiladas. Se sometieron a

electroforesis cantidades iguales de lisado celular mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para análisis western. Las manchas por duplicado se tiñeron para las formas fosforiladas y no fosforiladas de STAT 1, 3, 5 y 6 usando anticuerpos específicos para cada forma de la molécula STAT. Como controles positivos, se utilizaron células HELA, no activadas y activadas con interferón alfa.

- 5 Estos resultados indicaron que, bajo estas condiciones específicas, la señalización a través de MU-1 dio como resultado la fosforilación de STAT 5 en todos los puntos temporales probados (1=0, T=15', T=30', 1=60'). El tratamiento de los controles o de las células BAF-3 quiméricas con IL-3 dio como resultado la fosforilación de STAT 3, pero no STAT 1 o 5.

Ejemplo 4: Expresión de tejido de MU-1 murina y humana

10 Análisis Northern

Se realizaron transferencias Northern de polyA+ARN de diversos tejidos (Clontech, Palo Alto, CA) según las recomendaciones del fabricante. Para las manchas murinas, se utilizó un fragmento de 262 nucleótidos correspondiente a los nucleótidos 781-1043 de la Fig. 1 y SEQ ID NO: 9 para la hibridación.

- 15 Se detectó una única transcripción de MU-1 murina en tejidos de bazo, pulmón y corazón murinos adultos. El transcrito más grande observado en tejidos humanos no se observó en tejidos de ratón.

Se detectaron dos transcritos de MU-1 humana en tejidos linfoides humanos adultos, PBL, timo, bazo y ganglio linfático, y en pulmón fetal.

Hibridación *in situ*

- 20 Los estudios de hibridación *in situ* se realizaron por Phylogency Inc. of Columbus, OH (según el método de Lyons et al., 1990, J. Cell. Biol: 111:2427-2436). En resumen, secciones de parafina de 5-7 micras en serie fueron desparafinadas, fijadas, digeridas con proteinasa K, tratadas con trietanolamina y deshidratadas. Los ARNc se prepararon a partir de plantillas de ADNc linealizadas para generar sondas antisentido y sentido. Los transcritos de ARNc se sintetizaron de acuerdo con las condiciones del fabricante (Ambion) y se marcaron con 35S-UTP. Las secciones se hibridaron durante la noche, se lavaron rigurosamente y se trataron con RNAasa A y se sumergieron en una emulsión de rastreo nuclear y se expusieron durante 2-3 semanas. Las secciones de control se hibridaron con sondas sentido para indicar el nivel de referencia del procedimiento. La sonda murina consistió en un fragmento de 186bp correspondiente a los nucleótidos 860-1064 (SEQ ID NO: 9). La sonda humana fue un producto de PCR de 23 pb generado a partir de ADN de MU-1 humana.

- 30 Se observó expresión de MU-1 murina en los ganglios linfáticos del intestino delgado adulto en los centros germinales y muscular es externa. Los ganglios linfáticos especializados y los parches de Peyers también presentaron expresión murina de MU-1.

Se detectó expresión de MU-1 humana en centros germinales de los ganglios linfáticos en la corteza. La médula, que contiene macrófagos, fue negativa para MU-1 humana. En el bazo humano, se detectó la expresión de MU-1 humana en las regiones de pulpa blanca pero no de pulpa roja.

- 35 Ejemplo 5: Expresión de MU-1 humana en células y líneas celulares:

El análisis de protección de RNAasa se realizó sobre células T humanas en reposo y activadas y las líneas celulares B, Raji y RPMI 8866, y la línea celular Jurkat. Las células T humanas se activaron con anti-CD3 y anti-CD28. Las líneas celulares fueron activadas por el éster de forbol e ionomicina. El plásmido productor de ribosondas MU-1 se construyó insertando un producto de PCR de 23 pb (la PCR se realizó usando cebador 5'

- 40 CACAAAGCTTCAGTATGAGCTGCAGTACAGGAACCGGGGA (SEQ ID NO: 15) y cebador 3'

CACAGGATCCCTTAACTCCTCTGACTGGGTCTGAAAGAT (SEQ ID NO:16))

- 45 en los sitios BamH I e HindIII del vector pGEM3zf(-) (Promega, Madison, WI). Para realizar la ribosonda, el plásmido productor de ribosonda se linealizó con HindIII. El ADN resultante se extrajo con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol. T7 RNA polimerasa se utilizó para hacer la ribosonda de acuerdo con el protocolo sugerido por el vendedor (PharMingen, San Diego, CA). El ensayo de protección de RNAasa se realizó utilizando el sistema de ensayo de protección ribonucleasa RiboQuant Multi-Probe de PharMingen. 2.0 ug del ARN total se incluyeron en cada reacción de RPA, después de la digestión con RNAasa, las ribosondas protegidas se llevaron a cabo en un sistema QuickPoint de separación rápida de ácidos nucleicos (Novex, San Diego, CA). Los geles se secaron y se expusieron según la sugerencia del vendedor.

- 50 El ARN de MU-1 humana induce la expresión en células CD3+ purificadas humanas estimuladas con anti-CD3+ anti-CD28 cuando se compara con poblaciones no estimuladas. MU-1 también tiene expresión tras la reestimulación en

poblaciones de células T Th1 y Th2-sesgada. Las líneas de células B, RPMI 8866 y Raji, expresan constitutivamente MU-1 mientras que la línea de células Jurkat T no.

Ejemplo 6: Unión de MU-1 humana a citocinas conocidas

5 Se construyeron tanto proteínas de fusión de Ig humanas como murinas y se inmovilizaron en chips Biacore en un esfuerzo por identificar el ligando para MU-1. Se evaluó una variedad de medios acondicionados de cultivo celular, así como un panel de citocinas conocidas para la unión a MU-1. Algunas citocinas también se probaron en combinación con otras cadenas receptoras de la familia para considerar la posibilidad de que MU-1 pudiera requerir una segunda cadena receptora para la unión del ligando. Las siguientes citocinas se probaron y se encontró que eran negativas para la unión a MU-1: mL-2, hIL-2, hIL-i5, mL-7, TSLP, TSLP+IL7, TSLP+IL7R, TSLP+IL7g, 10 TSLP+IL-2, TSLP+1L2+IL2Rbeta, IL2Rbeta, IL2Rgamma, IL7R, IL2+2Rbeta, 1L2+2Rgamma, IL15+IL2Rbeta, 1L15+2Rgamma, 1L7+2Rgamma, IL2+IL7R, IL1 5+IL7R, IL7+IL7R. Los receptores conocidos se han inmovilizado también y se ha probado la unión de MUFc con resultados negativos. IL-IS se unirá a IL2Rb, pero no a IL2Rg o MUFc.

15 Ejemplo 7: Efecto de la modulación de la vía IL-21/IL-21R sobre la gravedad de los síntomas en los ratones con artritis inducida por colágeno (CIA)

Este ejemplo muestra que antagonistas de IL-21R, por ejemplo, proteínas de fusión de IL-21R-Ig (proteína IL21RFc murina o "mUL21RFc") o anticuerpos anti-IL21R, mejoran los síntomas en un modelo murino de artritis inducida por colágeno (CIA). Por el contrario, la administración de IL-21 exacerba los síntomas artríticos en ratones con CIA.

20 Se usaron ratones DBA/1 machos (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) para todos los experimentos. La artritis se indujo con el uso de colágeno bovino de tipo II (Chondrex, Redmond, WA). Se disolvió colágeno bovino tipo II (Chondrex, Redmond, WA) en ácido acético 0.1 M y se emulsionó en un volumen igual de CFA (Sigma) que contenía 1 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H37RA). 100 µg de colágeno bovino se inyectaron por vía subcutánea en la base de la cola el día 0. El día 21, se inyectaron ratones por vía subcutánea, en la base de la cola, con una solución que contenía 100 µg de colágeno bovino en ácido acético 0.1 M que se había mezclado con un volumen igual de adyuvante de Freund incompleto (Sigma). Los animales naive recibieron los mismos conjuntos de inyecciones, menos el colágeno. El protocolo de dosificación se muestra esquemáticamente en la figura 16. Mul21RFc se administró profilácticamente o terapéuticamente a ratones DBA. En el régimen terapéutico, el tratamiento se inició si la enfermedad se observó durante dos días consecutivos en un ratón.

30 Los ratones se controlaron al menos tres veces por semana para la progresión de la enfermedad. A las extremidades individuales se les asignó un puntaje clínico basado en el índice: 0=normal, sin hinchazón; 1=eritema visible acompañado de 1-2 dedos hinchados, o hinchazón leve en el tobillo; 2=eritema pronunciado, caracterizado por hinchazón de la pata de leve a moderada y/o dos dedos hinchados; 3=hinchazón extensa de toda la pata, esto es, extendiéndose en la articulación del tobillo o la muñeca; 4=resolución del hinchamiento, anquilosis de la pata; dificultad en el uso de la rigidez de la extremidad o de la articulación. De este modo, la suma de todas las puntuaciones de las extremidades para cualquier ratón dado produjo una puntuación total del cuerpo máxima de 16.

40 En varios estadios de la enfermedad, los animales fueron sacrificados, los tejidos fueron cosechados y las patas fueron fijadas en formol al 10% para histología o paraformaldeído al 4%, pH 7.47, descalcificado en EDTA al 20% (pH 8.0) y se incrustaron en parafina para hibridación *in situ*. Utilizando microscopía óptica, las patas se puntuaron con un método de puntuación de 5 grados (0-4) para caracterizar la intensidad y extensión de la artritis. Los infiltrados inflamatorios se utilizaron para la puntuación, además de otros cambios relacionados con la inflamación, tales como la formación de cataratas, fibras de la membrana sinovial, erosión del cartílago articular y/o la destrucción del hueso subcondral. Los grados de histología se determinaron usando lecturas de patas individuales: NAD=0 o nada anormal descubierto; 1=Ligero a moderado; 2: Suave a moderado; 3: Marcado y 4: Masivo.

45 Se observó una reducción en la gravedad de los síntomas después del tratamiento profiláctico de ratones con CIA usando mUL21RFc (100 µg o 200 µg) administrados por vía intraperitoneal (ip) cada dos días comenzando un día antes del refuerzo de colágeno (datos no mostrados).

Los efectos de mUL21RFc (200 µg/ratón 3x/semana) sobre un ratón con CIA semi terapéutico en función del día después del tratamiento se muestran en la figura 17. Se utilizó Ig de ratón (200 µg/ratón 3x/semana) como un control. Se muestra una reducción de la puntuación de gravedad a partir del día 7 después del tratamiento.

50 La administración de IL-21 exacerba los síntomas artríticos en ratones con CIA. La figura 18 es un gráfico que representa la puntuación media de CIA en función de los días posteriores al refuerzo del colágeno. Los ratones administrados con 1 mg de IL-21 murina por vía intraperitoneal (ip) mostraron puntuaciones de CIA más altas que los ratones control tratados con PBS.

55 Estos experimentos demuestran que la administración de un antagonista de IL-21R, por ejemplo, proteínas de fusión IL-21R-Fc, a ratones con CIA, ya sea profilácticamente o semiterapéuticamente, mejoró significativamente los síntomas artríticos. Por el contrario, la administración de IL-21 exacerba los síntomas.

Ejemplo 8 Hibridación *in situ* de transcritos de IL-21R

Se determinó la expresión de ARNm de IL-21R en patas artríticas de ratones con CIA. Se utilizaron ribosondas IL-21R murinas anti-sentido (Figura 19, panel A); Las sondas sentido se utilizaron como controles negativos (Figura 19, panel B).

- 5 Se prepararon sondas marcadas con digoxigenina con el uso de una mezcla de marcación de ARN DIG (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), según lo descrito por el fabricante. La expresión del ARNm del receptor de IL-21 se detectó en macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, una subpoblación de linfocitos, sinoviocitos y epidermis (Figura 19, panel A). Se observó una tinción disminuida en las patas de control o con sondas sentido (Figura 19, panel B). Las células positivas a ARNm de mL-21R fueron: neutrófilos (N), y macrófagos (M). La hibridación *in situ* muestra una expresión mejorada de IL-21R en las patas de ratones artríticos.

Ejemplo 9: La activación *in vivo* del receptor de IL-21 genera potentes respuestas antitumorales

- 15 Este ejemplo muestra que la administración de células tumorales que expresan IL-21 aumenta las respuestas antitumorales *in vivo* tanto en modelos tumorales inmunogénicos como no inmunogénicos. Las células T CD8+ y las células NK son necesarias para la destrucción de tumores y el posterior desarrollo de células T específicas de antígeno tumoral. La IL-21 presente en el microambiente tumoral potencia tanto la inmunidad innata como la inmunidad adaptativa *in vivo* en respuestas antitumorales.

Procedimientos experimentales

- 20 Ratones. Se adquirieron ratones C57BL/6, Balb/C, IFN γ ^{-/-} y IL-10^{-/-} hembras en referencia C57BL/6 de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). C57BL/6 scid y ratones desnudos fueron adquiridos de Taconic (Germantown, NY). Los ratones IL-21R^{-/-} se generaron en Wyeth Research, MA., y se mantuvieron en Charles Rivers Laboratories (Andover, MA) (Kasaian, M.T. et al. (2002) Immunity. 16:559-569). Los ratones se mantuvieron y se trataron de acuerdo con National Institutes of Health and American Association of Laboratory Animal Care regulations.

- 25 Líneas de células tumorales y reactivos. Se usaron dos líneas de células tumorales, melanoma B16F1 y fibrosarcoma MethA, en los experimentos descritos en este documento. El melanoma B16F1 y las células de fibrosarcoma de MethA se han utilizado extensivamente en modelos de vacunación de tumores para estudiar el efecto antitumoral *in vivo* de diversas citocinas. Las células tumorales B16F1 son poco inmunogénicas, ya que la vacunación previa con células tumorales de tipo salvaje irradiadas sólo protege al 20% de los ratones vacunados frente al desafío posterior a B16F1 vivos (Dranoff, G. et al. (1993) PNAS 90:3539-3543). Por el contrario, MethA, un fibrosarcoma inducido por metilantefina, es altamente inmunogénico (esto es, la vacunación con células MethA irradiadas conduce a protección casi al 100% contra el desafío de MethA vivo posterior).

- 30 Se mantuvieron células de melanoma B16F1 en cultivo en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal activado por calor al 10%, glutamina al 2% y penicilina-estreptomicina al 1%. Las células de fibrosarcoma de MethA se mantuvieron por paso intraperitoneal en ratones Balb/C. TRP-2 específico de (SVYDFVWL, SEQ ID NO:) (van Elsas, A. et al. (2001) Journal of Experimental Medicine 194:481-489; Suttmuller, R.P. et al. (2001) Journal of Experimental Medicine. 194:823-832) y péptido control OVA 257-264 (SIINFEKL, SEQ ID NO:) fueron sintetizados en la Wyeth Research, MA. Los Abs monoclonales anti-CD3, anti-CD28 e IgG2a de rata, y la citocina IL-2 utilizados en este documento se adquirieron todos de PharMingen (San Diego, CA).

- 35 Generación de IL-21 y proteína fluorescente verde (GFP) que expresan células tumorales. Las células tumorales B16F1 y MethA fueron diseñados para expresar IL-21 y GFP, o sólo GFP. Se construyeron vectores retrovirales que codifican mL21 -IRES-GFP o IRES-GFP utilizando vector GFP-RV (Ranganath, S. et al. (1998) Journal of Immunology 161:3822-3826). Se obtuvo un retrovirus de alto título transfectando la línea celular de envasado ecotrópico 293-VSVg (Ory, D.S. et al. (1996) PNAS 93:11400-11406). Las infecciones por centrifugación se realizaron a 1800 rpm durante 40 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron infectadas 3 veces. Las células tumorales que expresan GFP se enriquecieron mediante clasificación por flujo y la pureza de las células que expresan GFP fue superior al 90%.

- 40 Estudios de tumores *in vivo*. Ratones C57BL/6 fueron afeitados en la espalda y se les inyectó i.d. 10⁵ B16F1-IL-21 o B16F1-GFP control. Se inyectaron ratones Balb/C con ya sea 10⁶ o 2 x 10⁶ de MethA-IL-21 o células de control MethA-GFP. El crecimiento tumoral se controló midiendo diámetros perpendiculares con un calibrador. Los ratones fueron sacrificados cuando los tumores mostraron ulceración grave o alcanzaron un tamaño de 200 mm². En general, se utilizaron 10 ratones por grupo en cada experimento y se muestran resultados representativos a partir de experimentos repetidos dos o más veces con resultados similares.

- 45 Estudios de agotamiento *in vivo*. El agotamiento de las células T CD4+ o CD8+ se consiguió inyectando i.p. 400 μ g por ratón de cualquiera mAbs anti-CD4 (GK1.5), anti-CD8 (53-6.7) o control del isotipo IgG de rata durante tres días consecutivos antes de la inyección de células tumorales. Las inyecciones de Ab se continuaron cada dos días después de la inyección de células tumorales durante 12 días. Para el agotamiento de células NK, se inyectaron i.p. 50 μ l de ab policlonal asialo GM1 anti-ratón/rata de conejo (Cedarlane, Ontario, CA) un día antes de la inyección de

- células tumorales. Se usaron ratones inyectados de forma similar con suero normal de conejo para el control. Después de la inoculación de células tumorales, las inyecciones de anticuerpos se continuaron dos veces por semana durante dos semanas. Se confirmó el agotamiento de las células T y NK en los ganglios linfáticos y en el bazo un día antes de la exposición al tumor (para células T) o el mismo día del desafío de células tumorales (para células NK) por citometría de flujo usando anticuerpos relevantes. El análisis FACS mostró que más del 99% de la población relevante de células T o células NK se agotaron en ratones tratados con anti-CD4, anti-CD8, anti asialo GM1. Por el contrario, los ratones tratados con isotipos de control presentaron perfiles de linfocitos T similares a los perfiles de ratones no tratados.
- 5
- Ensayo inmunosorbente unido a enzima IL-21 (ELISA). Se ensayaron sobrenadantes durante la noche a partir de 10^6 células tumorales B16F1-IL-21, B16F1-GFP, MethA-IL-21 y MethA-GFP para los niveles de IL-21 mediante ELISA como se detalla en Dunussi-Joannopoulos, K. et al. (1998) Blood 91:222-230. En resumen, se utilizó mMu1-mutm IgG2a (Wyeth Research, MA) como anticuerpo de recubrimiento y se utilizó IL-21 anti-ratón (R&D systems, Minneapolis, MN.) como Ab de captura. Se usó como control el mL-21 purificado (Wyeth Research, MA) (Kasaian, M.T. *et al.* (2002) *supra*).
- 10
- Expresión de ARNm de IL-21R detectada por Taqman. Se aisló ARN de diferentes líneas celulares tumorales de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega, Madison, WI). Se utilizó ARNm extraído de esplenocitos que se habían activado con mAb anti-CD3 (1 μ g/ml) y anti-CD28 (1 μ g/ml) (BD PharMingen) durante 24 horas para el control positivo. El ARN purificado se trató con DNasa (Ambion Inc, Austin, Tx) y se ajustó a una concentración de 50 ng/ μ l antes del análisis de ARNm mediante el análisis cuantitativo de reacción en cadena de polimerasa (PCR) TaqMan. Se diseñaron pares de cebadores específicos de ciclofilina e IL-21R y sondas usando el software PrimerExpress y fueron preparados por Wyeth Research (cebadores: 5'-GCCTTCTCAGGACGCTATGAT-3' (SEQ ID NO:40) y 5'-CCCTACAGCACGTAGTTGGA-3' (SEQ ID NO:41) y sonda TCCTGGGACTCAGCTTATGACGAACC) (SEQ ID NO:42). Se generaron curvas estándar para cada gen con ARN de células que expresan IL-21R conocidas. La expresión de ARNm en líneas celulares control y transducidas se normalizó basándose en la expresión de ciclofilina en cada línea celular y los resultados se presentan como unidades relativas (R.U.) de ARNm.
- 15
- 20
- 25
- Ensayo de proliferación. Se estimularon esplenocitos (2 x 10^5 células/pozo) de ratones ya sea C57BL/6 o Balb/C con diversas concentraciones de células tumorales irradiadas singénicas que expresaban ya sea GFP o IL-21 en placas de 96 pozos. Se adicionó 3 H timidina a 1 μ Ci/pozo (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) durante las últimas 6 horas de cultivo. Después de recolectar el sobrenadante en esterillas de filtro de fibra de vidrio, se determinó la incorporación de 3 H-timidina por recuento de centelleo líquido.
- 30
- Ensayo Elispot. Las respuestas de células T específicas de TRP-2 se determinaron mediante el kit IFN- γ Elispot (R&D systems) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se colocaron 2×10^5 a 4×10^5 de esplenocitos (de ratones inyectados de tumor) en 200 μ l de medio completo que contiene 5 μ g/ml de péptidos específicos de TRP-2 (van Elsas, A. (2001) J. Exp. Med.194:481-489) o péptidos OVA no específicos y 20U/ml de IL-2 murina (PharMingen) en cada pozo. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C en un incubador de CO₂. Las placas se incubaron después durante la noche a 4°C con detección de Ab, seguido de incubación de 2 horas con conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina. Las manchas se visualizaron con sustrato de fosfatasa alcalina de sal 5-bromo-4 cloro-3' indolilfosfato p-toluidina/nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT) (R&D systems). Las placas se lavaron con agua del grifo y se secaron al aire, y se contaron las manchas con un estereomicroscopio y se volvieron a calcular por 10^6 células con manchas basales restadas. Generalmente, se detectaron menos de 10 manchas/pozo cuando se utilizó el péptido OVA como antígeno.
- 35
- 40
- Reestimulación *in vitro* de esplenocitos de ratones inoculados con células tumorales. Se generaron líneas de células T específicas de péptidos tumorales como se describe en Bloom, M.B. et al. (1997) J. Exp. Med. 185:453-459. En resumen, los ratones fueron inoculados con células ya sea B16F1-GFP o B16F1-IL-21. Después de 8-11 días, se recolectaron esplenocitos y se cultivaron con 5 μ g/ml de péptido TRP-2 (van Elsas, A et al. (2001) *supra*). Al tercer día de cultivo, se adicionaron 20 U/ml de IL-2 (BD PharMingen) a cada cultivo. Después de 5 días, se usaron células para el ensayo de liberación de 51 Cr.
- 45
- Ensayo CTL. La citotoxicidad contra dianas se cuantificó usando un ensayo de liberación de 51 Cr de 4 h. En resumen, las células RMA-S se pulsaron con péptido TRP-2 a 10 μ g/ml y se marcaron con Na₂ 51 CrO₄ (PerkinElmer Life Sciences) durante 1 h a 37°C. Después del lavado, las células diana marcadas con 51 Cr se incubaron con líneas de células T generadas a partir de ratones C57BL/6 inyectados con células tumorales descritas anteriormente en diferentes proporciones E:T en placas de fondo redondo 96. Después de 4 horas de incubación a 37°C, se recogieron los sobrenadantes y se detectó la radiactividad en un contador de centelleo (Wallac, Turku, Finlandia). El porcentaje de lisis específica se calculó como $100 \times$ [(liberación por liberación espontánea de CTL)/(liberación máxima-liberación espontánea)]. La liberación máxima se determinó mediante la adición de Triton X-100 al 1%. La liberación espontánea en ausencia de CTL fue generalmente inferior al 15% de la liberación máxima.
- 50
- 55
- Células MethA y B16F1 transducidas con IL-21 segregan IL-21 biológicamente funcional

Se transdujeron células tumorales B16F1 y MethA para expresar GFP más IL-21 (B16F1/MethA-IL21) o GFP (B16F1/MethA-GFP), respectivamente. Los sobrenadantes durante la noche a partir de 10^6 células B16F1-IL-21, B16F1-GFP, MethA-IL-21 o MethA-GFP se ensayaron mediante ELISA como se describe en protocolos experimentales, anteriormente. Como se muestra en la figura 20A, las células B16F1-IL-21 y MethA-IL-21, pero no las células tumorales B16F1-GFP o MethA-GFP, secretaron una cantidad sustancial de IL-21 en cultivos durante la noche. Para determinar si la citocina IL-21 secretada por las células transducidas era funcional biológicamente, se usaron células tumorales que expresan IL-21 o GFP irradiadas para estimular esplenocitos singénicos naïve de ratones C56BL/6 o Balb/C en presencia de una cantidad subóptima de anti-CD3 (500 ng/ml) y anti-CD28 (10 µg/ml). Como se muestra en la figura 20B y 20C, las células B16F1-IL-21 y MethA-IL-21 aumentaron la proliferación de esplenocitos naïve cuando se compararon con las células que expresan GFP de control en todas las concentraciones probadas. Estos resultados sugieren que la IL-21 secretada por células tumorales transducidas es biológicamente funcional.

IL-21 no ocasiona el crecimiento de las células tumorales *in vitro*

Se examinó el efecto de IL-21 sobre las características de crecimiento *in vitro* de células B16F1 y MethA transducidas. Se cultivaron células tumorales B16F1-IL-21 y B16F1-GFP o MethA-IL-21 y MethA-GFP a una concentración de $10^5/1.5$ ml de medio de cultivo en placas de 12 pozos. Los números de células se controlaron diariamente mediante ensayo de exclusión de azul de tripano. Los resultados se presentan como medios de duplicados. Se utilizó ARN de los esplenocitos C57BL/6 activados con mAb anti-CD3 y anti-CD28 como control positivo. Se cultivaron números iguales de células tumorales en placas de 12 pozos, y se determinaron números de células viables en diversos puntos temporales. Como se muestra en la figura 21A y 21B, la cinética de crecimiento de células tumorales productoras de IL-21 era muy similar a la de las células tumorales de control que expresaban GFP en un periodo de 5 días. Esto indica que IL-21 no tuvo ningún efecto aparente sobre las características de crecimiento *in vitro* de las células tumorales transducidas. La falta de respuesta de las células tumorales a IL-21 se confirmó además con la falta de la expresión de IL-21R por las células tumorales en el análisis cuantitativo PCR Taqman. La figura 21C es un gráfico de barras que representa la cuantificación de ciclofilina y el ARNm de IL-21R extraído de células tumorales transducidas, determinado por PCR Taqman. La expresión del ARNm de IL-21R en las células transfectadas se normalizó a los valores de ciclofilina y se expresó como unidad relativa (R.U.). Se utilizó ARN de los esplenocitos C57BL/6 activados con mAb anti-CD3 y anti-CD28 como control positivo.

IL-21 inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*

Para evaluar los efectos *in vivo* de IL-21 sobre el crecimiento de tumores, se inocularon i.d. células tumorales B16F1-IL-21 o MethA-IL-21 en el flanco de ratones singénicos. Como se muestra en la figura 22A, no se detectó formación de tumores en ninguno de los ratones C57BL/6 inoculados con células tumorales B16F1-IL-21 durante más de 27 semanas después de la inyección del tumor. Por el contrario, todos los ratones C57BL/6 portadores de células B16F1-GFP crecieron tumores comenzando ya en el día 9. Los tumores de control aumentaron rápidamente en tamaño y estos ratones tuvieron que ser sacrificados dos a tres semanas después de la inoculación de células tumorales debido a la pesada carga tumoral. En el modelo MethA, se detectaron masas tumorales pequeñas pero palpables una semana después de la inoculación del tumor con células ya sea MethA-IL-21 o MethA-GFP en ratones Balb/C (Figura 22B). Sin embargo, los tumores de MethA-IL-21 se redujeron gradualmente en tamaño a partir de la segunda semana (día 11) y eventualmente retrocedieron completamente en el 100% de ratones, mientras que el 80% de los tumores de MethA-GFP de control continuaron creciendo hasta que los ratones fueron sacrificados. Estos resultados muestran que la presencia de IL-21 en el microambiente tumoral desencadena potentes respuestas inmunes que conducen al rechazo tanto de tumores inmunogénicos como no inmunogénicos.

IL-21 no puede prevenir el crecimiento tumoral en ratones scid y desnudos

Con el fin de determinar las funciones relativas de las respuestas inmunes celulares y humorales en el rechazo de células tumorales transducidas con IL-21, se inyectaron números iguales (10^5) de células control B16F1-IL-21 o B16F1-GFP en ratones deficientes (scid) en células T y B. Tanto las células B16F1-IL-21 como B16F1-GFP mostraron una cinética de crecimiento similar en ratones scid (Figura 23A), lo que indica que se necesitan linfocitos (células B y/o T) para el rechazo del tumor mediado por IL-21. El papel de las células T también se confirmó en experimentos con ratones desnudos/desnudos C57BL/6. Como se muestra en la figura 23B, todos los ratones desnudos inoculados con células B16F1-IL-21 desarrollaron tumores, aunque con una cinética de crecimiento más lenta. En conjunto, estos resultados indican que las respuestas antitumorales mediadas por IL-21 requieren la participación de la inmunidad adaptativa.

Se requieren células T CD8⁺, pero no células T CD4⁺ para el rechazo del tumor mediado por IL-21

Para examinar detenidamente además qué subconjunto(s) de células T es(son) importante(s) para el efecto inducido por IL-21, se realizó el agotamiento *in vivo* de subpoblaciones de linfocitos administrando mAbs anti-CD4 o anti-CD8. Como se muestra en la figura 25A, tumores B16F1-IL-21 no crecieron en ratones con agotamiento de células T CD4⁺ y en ratones tratados con IgG de rata de control. Sin embargo, los tumores palpables surgieron en siete de cada diez ratones con agotamiento de células T CD8⁺ sugiriendo que las células T CD8⁺, pero no CD4⁺ son necesarios para la respuesta antitumoral inducida por IL-21. De interés, el crecimiento de B16F1-IL-21 en ratones

con agotamiento de células T CD8+ se retrasó significativamente sugiriendo que las células distintas de las células T CD8+ pueden ser responsables de la supresión del crecimiento de tumores en fase temprana.

Se requieren células NK para la respuesta antitumoral inducida por IL-21

5 La evidencia experimental acumulada apoya el papel de las células NK como primera línea de defensa en la promoción de la inmunidad antitumoral (Smyth, M.J. et al. (2001) *International Immunology* 13:459-463; Smyth, M.J. et al. (2002) *Curr. Opin.Immunol.* 14:165-171; Smyth, M.J. et al. (2002) *Blood.* 99:1259-1266). Esta posibilidad se examinó inyectando un número igual de células tumorales B16F1-IL-21 en ratones con agotamiento de células NK o ratones C57BL/6 control. No se observó formación de tumor detectable en ratones C57BL/6 control, mientras que todos los ratones con agotamiento de células NK crecieron tumores dos semanas después de la inoculación de células tumorales B16F1-IL-21. Este resultado demuestra que las células NK, además de las células T CD8+, son necesarias para la respuesta antitumoral inducida por IL-21.

IL-21 apoya la generación de células T específicas de antígeno tumoral que secretan IFN γ y mejora la actividad CTL específica de antígeno tumoral.

15 Se ha demostrado recientemente que un péptido noamérico que consiste en los residuos 180-188 de la proteína 2 relacionada con el antígeno tirosinasa (TPR-2) de la diferenciación de melanocitos normal, es uno de los antígenos de rechazo tumoral para el melanoma B16 que es reconocido por los linfocitos T citotóxicos reactivos al melanoma B16 (van Elsas, A. et al. (2001) *supra*; Suttmuller, R.P. (2001) *J. Exp. Med.* 194:823-832). El péptido TPR-2 se usó para evaluar el efecto *in vivo* de IL-21 sobre las respuestas de células T. Los esplenocitos de ratones inyectados con ya sea células B16F1 que expresan GFP o IL-21 se estimularon *in vitro* con péptido TPR-2 en un ensayo de IFN γ ELISPOT. Como se muestra en la figura 26A, el número de células productoras de IFN γ en ratones inyectados con B16F1-IL-21 fue 3 veces mayor que el de los ratones inyectados con B16F1-GFP. Para caracterizar adicionalmente las respuestas de células T antitumorales mediadas por IL-21, los esplenocitos de ratones inyectados con el tumor que expresan ya sea IL-21 o GFP se estimularon inicialmente *in vitro* con el péptido TRP-2 como se describe en este documento y luego se usaron para ensayos CTL *in vitro*. La línea celular B16F1 utilizada en los experimentos descritos en este documento expresa un nivel bajo de moléculas de MHC de clase I, como se determinó con citometría de flujo (van Elsas, A. et al. (2001) *supra*; Suttmuller, R.P. (2001) *supra*; Lim, Y.S. et al. (1998) *Molecules & Cells* 8:629-636). Por lo tanto, células RMA-S se utilizaron como células presentadoras de antígeno en nuestros ensayos CTL. Como se muestra en la figura 26B, los esplenocitos de ratones inyectados con B16F1-IL-21 tenían actividad citolítica mejorada frente a células RMA-S pulsadas con péptido TRP-2 en comparación con el tumor que expresa GFP (Figura 26C) a todas las proporciones E:T, a pesar de cierta reactividad cruzada observada hacia el péptido OVA. Estos resultados indican que el rechazo del tumor mediado por IL-21 apoya el desarrollo de respuestas de células T citolíticas específicas de antígeno tumoral. El TRP-2 es uno de los antígenos que se comparte entre las células tumorales B16F1 y los melanocitos normales, de este modo los CTL detectados en este documento son en realidad células T autorreactivas. De hecho, el 10-20% de ratones C57BL/6 desarrollaron cabello local y despigmentación de la piel en el sitio de la célula tumoral de B16F1-IL-21 pero no de la inyección de célula de control (datos no mostrados).

Respuesta antitumoral inducida por IL-21 es independiente de IFN- γ e IL-10

40 Se ha informado anteriormente que IFN γ e IL-10 son importantes para el rechazo de tumores Gerard, C.M. et al. (1996) *Human Gene Therapy.* 7:23-31; Lim, Y.S. et al. (1998) *Molecules & Cells* 8:629-636). Los resultados de ELISOP sugieren que IL-21 mejoró las células tumorales específicas que producen IFN γ pero no IL-10. Para probar la participación de IFN γ e IL-10 en el efecto antitumoral mediado por IL-21, se inyectaron números iguales de células tumorales B16F1-IL-21 o B16F1-GFP en ratones IFN γ ^{-/-} o IL-10^{-/-}. Como se muestra en las figuras 27A-27B, ninguno de los ratones deficientes en citocinas anteriormente citados formó tumores después de la inyección de células B16F1-IL-21. Sin embargo, las células de control de B16F1-GFP crecieron tumores en todos los ratones IFN γ ^{-/-} e IL-10^{-/-}. Estos datos muestran que el efecto antitumoral mediado por IL-21 no requiere la participación activa de IFN γ o IL-10.

50 La terapia génica de citocina se usó para estudiar el potencial inmunoregulador *in vivo* de IL-21. Este ejemplo muestra que la IL-21, cuando se secreta en el sitio del tumor por melanoma B16F1 modificado genéticamente o células de fibrosarcoma de MethA, estimula las respuestas inmunes antitumorales eficaces que requieren la presencia de la IL-21R cognada (Figura 23). Las células T CD8+ y las células NK son necesarios para la destrucción del tumor y el posterior desarrollo de células T específicas de antígeno tumoral (Fig. 24A y 24B). Las citocinas Th1 y Th2 principales, IFN γ e IL-10, respectivamente, no parecen ser esenciales para las respuestas antitumorales mediadas por IL-21 (Figuras 26A y 26B).

55 La eliminación rápida y definitiva de células tumorales de melanoma B16 transducidas con IL-21 descrita en este documento está en contraste con los datos obtenidos en otros modelos de vacunación con genes de citocinas. Los ratones inmunizados con vacunas B16 transducidas con IL-4-, IL-5-, IL-6-, IL-12-, IFN γ -, TNF α - o GM-CSF mostraron retraso moderado en la formación de tumores, aunque eventualmente todos los ratones sucumbieron a tumores letales (Dranoff, G. et al. (1993) *PNAS* 90:3539-3543; Nagai, H. et al. (2000) *J. Invest. Dermat.* 115:1059-1064).

Además, las células que expresan GM-CSF, IL-5, IL-6, y TNF- α causaron efectos secundarios significativos, que van desde hepatoesplenomegalia, debilitamiento y temblores hasta la muerte. Hasta la fecha, sólo se ha informado en la bibliografía que IL-2 e IL-10 inducen la regresión completa de los tumores B16 transducidos *in vivo* (Dranoff, G. *et al.* (1993) *supra*; Gerard, C.M. (1996) *Human Gene Therapy* 7:23-31). En los estudios descritos en este documento, ratones singénicos inyectados con células tumorales transducidas B16F1-IL-21 o MethA-IL-21 vivas no desarrollaron tumor clínicamente manifiesto durante un período de más de 27 semanas después de la inoculación del tumor. Además, el análisis por citometría de flujo de células linfoides de bazos y ganglios linfáticos eliminados de ratones inmunizados no mostró cambios importantes en la población de células (datos no mostrados), lo que sugiere que la secreción paracrina de IL-21 en el microambiente tumoral orquesta respuestas antitumorales eficaces sin causar efectos secundarios sistémicos detectables.

El tumor B16F1-IL-21 creció en ratones IL-21R^{-/-} pero no en ratones C57BL/6 (control). Esto indica fuertemente que la interacción de IL-21 e IL-21R es crítica para el efecto mediado por IL-21 a pesar de la aparente redundancia en la vía de señalización de IL-21R con otros receptores de citocinas (Parrish-Novak *et al.* (2000) *supra*; Ozaki *et al.* (2000) *supra*; Asao *et al.* (2001) *supra*). Sin embargo, la proliferación de tumores B16F1-IL-21 en ratones IL-21R^{-/-} no debe atribuirse a un defecto intrínseco en el desarrollo de células T y NK, ya que los ratones IL-21R^{-/-} tienen células NK y T normales que responden a citocinas distintas de IL-21 (Kasaian, M.T. *et al.* (2002) *supra*).

El sistema inmune innato y adaptativo puede participar en las respuestas inmunes contra tumores. La IL-21 puede potenciar la activación tanto de células NK como T *in vitro*. El experimento de agotamiento *in vivo* descrito en este documento mostró que tanto las células NK como las células T CD8⁺ son necesarias para el rechazo completo del tumor de IL21-B16F1. La participación de las células NK en la vigilancia del tumor se confirma por el experimento de agotamiento de NK descrito en este documento (Figura 24B). Dado que las células B16F1-IL-21 expresan un nivel muy bajo de moléculas MHC de clase I (datos no mostrados), la inoculación de células B16F1-IL-21 vivas puede generar una respuesta inflamatoria local inicial. Las células NK pueden actuar como una primera línea de defensa contra células tumorales (Trinchieri, G. (1994) *J. Exp. Med.* 180:417-421; Levitsky, H.I. *et al.* (1994) *J. Exp. Med.* 179:1215-1224; Wu, T.C. (1995) *J. Exp. Med.* 182:1415-1421). Esta fase temprana de la muerte de tumores genera una plétora de antígenos derivados de tumores, que a su vez pueden ser absorbidos por APC profesionales y presentados a células T citotóxicas restringidas por MHC. La contribución de las células NK a la vigilancia temprana de las células B16F1-IL-21 antes de que se generen respuestas inmunes adaptativas se refleja adicionalmente en el crecimiento del tumor B16F1-IL-21 significativamente retardado en ratones con agotamiento de células T CD8⁺ (figura 24A).

La evidencia de la participación de células T en la regresión del tumor inducida por IL-21 es proporcionada por la restauración del crecimiento tumoral en ratones desnudos (Figura 23B). Tanto las células T CD4⁺ como las CD8⁺ se han descrito en diversas estrategias de vacunas basadas en células tumorales que son importantes para la inducción de la regresión del tumor y el desarrollo de inmunidad protectora (Colombo, M.P., y G. Forni (1994) *Immunology Today* 15:48-51; Hock, H. *et al.* (1993) *PNAS* 90:2774-2778; Hung, K. *et al.* (1998) *J. Exp. Med.* 188:2357-2368; Segal, B.M. *et al.* (2002) *J. Immunol.* 168:1-4). Los estudios han demostrado que se necesitan células auxiliares T CD4⁺ para la activación de células T CD8⁺ naíve (Clarke, S.R. (2000) *Journal of Leukocyte Biology.* 67:607-614). Por el contrario, los hallazgos descritos anteriormente demuestran que se requieren células T CD8⁺, pero no CD4⁺, para la respuesta antitumoral de IL-21. Los hallazgos en este documento descritos parecen ser consistentes con estudios recientes que han demostrado que la eliminación de células T CD4⁺ puede mejorar realmente el efecto antitumoral de la terapia génica de citocinas *in vivo* (Sutmuller, R.P. *et al.* (2001) *Journal of Experimental Medicine.* 194:823-832; Nagai, H. *et al.* (2000) *Journal of Investigative Dermatology* 115:1059-1064). La IL-21 también puede potenciar la activación de células T CD8⁺ naíve disminuyendo el umbral de coestimulación necesaria para la activación de células T y/o aumentando la presentación de antígenos de APCs portadoras de IL-21R (Schoenberger, S.P. *et al.* (1998) *Nature.* 393:480-483; Bennett, S.R. *et al.* (1998) *Nature* 393:478-480).

Los ratones inyectados con células tumorales B16F1-IL-21 desarrollaron despigmentación de cabello y piel alrededor de los sitios de inyección. Es probable que la autoinmunidad contra el melanocito de ratón normal se indujo a través de un epítipo común compartido con células tumorales B16 en la proximidad cercana de los sitios de inyección de tumores. Utilizando células de melanoma B16 transducidas con gen de citocina junto con el agotamiento de anti-CD4 o el bloqueo de CTLA-4, otros investigadores también han reportado observación similar. Sin embargo, la despigmentación de la piel es similar al vitíligo, sugiriendo una implicación más sistémica de las células putativas autoinmunes contra los melanocitos (Sutmuller, R.P. *et al.* (2001) *Journal of Experimental Medicine.* 194:823-832; Nagai, H. (2000) *Journal of Investigative Dermatology.* 115:1059-1064; van Elsas, A. *et al.* (1999) *Journal of Experimental Medicine.* 190:355-366). El TRP-2 es uno de dichos epítopos compartidos entre células tumorales B16F1 y melanocitos normales. Dado que las células T con elevada afinidad con los autoanticuerpos se agotan en el timo, las células T específicas de TRP-2 que escapan del agotamiento del timo deben ser de baja avidéz. No obstante, los ratones inyectados con tumor B16F1-IL-21 tienen más de tres veces de células T específicas de TRP-2 que los ratones inyectados con tumor B16F1-GFP (control), lo que sugiere que IL-21 reduce el umbral para la activación de células T naíve en ratones inyectados con B16F1- IL -21.

La actividad antitumoral de IL-21 también se correlaciona con funciones de células T CD8⁺ mejoradas, como se demuestra tanto por la producción incrementada de IFN γ específica de antígeno, como por actividades de CTL

tumorales aumentadas. Aunque se ha descrito que IFN γ e IL-10 juegan un papel esencial en el rechazo tumoral, nuestros experimentos con ratones deficientes en IFN γ e IL-10 indican que su presencia no es necesaria para el rechazo del tumor mediado por IL-21.

5 En resumen, los resultados presentados en este documento sugieren que al menos tres mecanismos mutuamente no exclusivos subyacen a la respuesta antitumoral mediada por IL-21: (1) la secreción paracrina de IL-21 en el microambiente tumoral desencadena y soporta la vigilancia del tumor innato inicial mediada por células NK; (2) IL-21 activa APCs y facilita la captación de residuos tumorales y posterior presentación de antígenos tumorales a células T naïve, de ahí la respuesta inmune adaptativa por células T CD8⁺; (3) La IL-21 reduce el umbral para la activación de células T naïve, permitiendo así el reclutamiento y activación de células T autorreactivas de baja afinidad que escapan a la tolerancia central.

10 Ejemplo 10: IL-21 mejora las respuestas de células T CD8⁺ específicas de antígeno

Este ejemplo muestra que un análisis de la expresión de ARNm de IL-21 e IL-21R, y los efectos de IL-21 sobre las respuestas de células T CD8⁺ murinas. Las células T CD8⁺ naïve expresan IL-21R y la expresión se aumenta por estimulación. Las células T CD8⁺ sólo expresan ARNm de IL-21 detectable cuando se estimulan en presencia de IL-21 exógena. La IL-21 aumenta específicamente la proliferación de células T CD8⁺ estimuladas con mAb anti-CD3 o antígeno, aunque no es tan potente como la IL-2 a niveles limitantes de estimulación. Sin embargo, en comparación con la IL-2, la presencia de IL-21 durante el cebado *in vitro* de células T CD8⁺ dio como resultado el desarrollo de células efectoras con mayor capacidad para lisar las células diana y producir IFN γ . Estos hallazgos apoyan un papel de la IL-21 en la generación de respuestas de las células T CD8⁺.

20 Protocolos experimentales

Reactivos. La IL-21 murina se produjo por transfección de células COS y concentración del sobrenadante; la actividad se denomina a rmlIL-21 (R&D Systems, Minneapolis, MN) por bioensayo. Se usaron volúmenes equivalentes de sobrenadante de transfectante simulado concentrado como control. IL-21R.Fc se construyó uniendo el dominio extracelular pronosticado de IL-21R humana a cola de carboxi de IgG2a murina con mutaciones para minimizar la unión de Fc y la fijación del complemento. Se usaron como se indica rhIL-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN), rmlIL-12 (Wyeth, Cambridge, MA), rmlIL-15 (R & D Systems), rmlIL-21 (R&D Systems).

Ratones. ratones 2C TCR Tg cuyo TCR es específico para el aloantígeno Ld fueron criados y mantenidos en Charles River Laboratories (Wilmington, MA).

RPA

30 Ensayos de células T. Las células T se purificaron a partir de los ganglios linfáticos TCR 2C Tg usando columnas de selección negativas (R&D Systems) o se clasificaron basándose en la expresión de CD8 y CD62L. Se estimularon las células T purificadas (2×10^5 /ml) con mAb anti-CD3 unido a placa (2C11, Wyeth, Cambridge, MA) o esplenocitos Balb/c irradiados (2000R, $1-5 \times 10^6$ /ml) y citocinas como se indica. La proliferación se determinó mediante incorporación de 3H-timidina (1 uCi/pozo). Para el cebado, los cultivos se ajustaron como anteriormente con las citocinas indicadas durante 4-6 días. Se recogieron las células, se lavaron, se contaron y se usaron en ensayos de CTL de 4 h con dianas 5×10^3 de P815 (específico) o EL4 (no específico) marcadas con 51Cr en las proporciones efector:diana clasificadas o reestimuladas en placas recubiertas con mAb anti-CD3), durante 40 horas.

40 Expresión de IL-21R e IL-21 por células T CD8⁺. Los informes anteriores han demostrado una expresión limitada de linfocitos de expresión de IL-21R y IL-21 por células T CD4⁺ humanas activadas. Utilizando ensayos de protección de RNAasa se ha analizado la expresión de ARNm de IL-21R y IL-21 por células T CD8⁺ murinas naïve. Las células CD8⁺ CD62L⁺ 2C TCR⁺ se clasificaron y se estimularon con mAb anti-CD3 en presencia de sobrenadante COS transfectado de IL-21 o simulado o mAb anti-CD28 y se preparó ARN para ensayos de protección con RNAasa de IL-21R o IL-21 (Figura 27A).

45 Las células T CD8⁺ recién aisladas expresaron ARNm de IL-21R implicando que estas células son capaces de responder a IL-21. La cuantificación de la intensidad de la señal con respecto a un estándar interno mostró que la activación mediada por TCR dio como resultado un aumento de ~2 veces en los niveles de ARNm de IL-21R (Figura 27A). La activación de TCR con coestimulación de CD28 dio como resultado un aumento de ~4 veces del ARNm de IL-21R, lo que sugiere que la activación fisiológica de 2 señales de células T CD8⁺ daría como resultado un aumento de la expresión de IL-21R y una sensibilidad aumentada a IL-21. Curiosamente, la presencia de IL-21 durante la estimulación también indujo un aumento de ~ 4 veces en la expresión de IL-21R, proporcionando evidencia de un mecanismo de IL-21 para amplificar la respuesta de IL-21 durante la activación de células T CD8⁺. La expresión de IL-21R por células T CD8⁺ naïve la distingue de receptores de otras citocinas que también actúan sobre células T CD8⁺ tales como las de IL-2, IL-12 o IL-15 que requieren activación para expresión. Se observaron resultados casi idénticos en células T CD8⁺ no transgénicas (datos no mostrados).

55 La expresión de ARNm de IL-21 se analizó a partir de las mismas células T CD8⁺ murinas purificadas. Se descubrió que las células T CD8⁺ murinas activadas con mAb, anti-CD3/anti-CD28, o anti-CD3 naïve no expresaban un ARNm

de IL-21 significativo (Figura 28B). Esto está de acuerdo con los resultados utilizando células T CD8+ humanas y contrasta con observaciones en células T CD4+ en las que se ha demostrado que la activación aumenta la expresión de ARNm de IL-21. Curiosamente, la estimulación con mAb anti-CD3 e IL-21 exógeno dio como resultado un fuerte aumento de la expresión de ARNm de IL-21 (2 veces después de 36 horas y 8 veces después de 60 horas de estimulación) mostrando que las células T CD8+ son capaces de producir esta citocina.

De este modo, las células T CD8+ expresan el ARNm de IL-21R y, en presencia de IL-21 exógena, aumentan la expresión de IL-21R, así como la expresión de IL-21 de novo. Las células T CD4+ activadas son la fuente probable de la IL-21 inicial que conduce estos eventos. De esta manera, IL-21 es similar a IL-2 que también se produce predominantemente por células T CD4+ y se utiliza por células T CD8+. Los resultados sugieren que existe un mecanismo para mantener la respuesta de IL-21, durante la activación de células T CD8+, independiente de IL-21 derivado de células T CD4+. IL-21 mejora la proliferación de células T CD8+.

Se ha demostrado que IL-21 aumenta la proliferación de células B humanas estimuladas con anti-CD40 y células T humanas y murinas estimuladas con mAb anti-CD3 inmovilizado [1,2]. En este documento, se analizó el efecto de la IL-21 en la estimulación de antígenos de células T CD8+ murinas purificadas y se encontró que la proliferación de células T CD8+ 2C fue mejorada por IL-21 de una manera dependiente de la dosis (Figura 29A). IL-21 exhibió una potencia similar a IL-15, pero no fue tan potente como IL-2 o IL-12 (Figura 29B).

Debido a que la IL-21 puede afectar la función de las células B [1], el siguiente experimento evalúa si la IL-21 aumentaba la proliferación de células T CD8+ 2C actuando directamente sobre células T o indirectamente a través de efectos sobre las APC en este sistema. Las células T CD8+ 2C purificadas se estimularon con mAb anti-CD3 inmovilizado en presencia de cantidades crecientes de IL-21 (Figura 28C). Al igual que con las respuestas de antígeno, IL-21 aumentó la proliferación de células T CD8+ a la estimulación anti-CD3 de una manera dependiente de la dosis. Aunque esto no descarta un posible efecto de IL-21 en APCs, sí apoya que esta citocina puede actuar directamente sobre las células T para modular su función. La comparación de los efectos de las citocinas utilizando la estimulación anti-CD3 de células T CD8+ reveló que la IL-21 y la IL-15 inducen niveles similares de proliferación, sin embargo, la IL-2 y la IL-12 son más potentes que la IL-21 para inducir la proliferación (Figura 28D).

Debido a que la IL-21 usada en la mayoría de estos estudios era sobrenadante concentrada a partir de transfectantes COS, se usó una proteína de fusión IL-21R.Fc para neutralizar específicamente las respuestas de IL-21. Los ELISA se realizaron para mostrar que mL-21R.Fc unido a mL-21, y que era capaz de neutralizar la unión de IL-21 a su receptor (datos no mostrados). Se estimularon células T CD8+ 2C con mAb anti-CD3 inmovilizado y cantidades crecientes de IL-21 en presencia o ausencia de IL-21R.Fc (Figura 28C). La respuesta inducida por IL-21 se inhibió por la adición de IL-21R.Fc soluble que muestra que la proliferación aumentada observada en presencia de sobrenadante de transfectante de IL-21 se debió específicamente a IL-21. IL-21R.Fc no tuvo ningún efecto sobre la proliferación mediada por IL-2 o IL-15 (datos no mostrados).

La IL-21 aumentó específicamente la proliferación inducida por antígeno de células T CD8+ murina, resultando en promedio una proliferación de 3 veces y 6 veces mayor con estimulación anti-CD3 o antígeno, respectivamente (n=5). Esto puede ser el resultado de niveles comparativamente más bajos de expresión de IL-21R, competencia para gammaC en el caso de IL-2 e IL-15, o el efecto biológico de esta citocina. Los datos mostrados en este documento extienden nuestros resultados anteriores muestran que IL-21 aumentó la proliferación de la estimulación de aloantígeno de células T no separadas y subraya la importancia potencial de la IL-21 en respuestas fisiológicas mediadas por células T CD8+. Por el contrario, con su capacidad para potenciar la proliferación de células T CD8+, IL-21 no soporta el crecimiento de células NK murinas e inhibe el crecimiento de células NK mediadas por IL-15. Estos resultados sugieren que IL-21 puede activar distintos programas de señalización en diferentes tipos de células. De acuerdo con los resultados utilizando células T no separadas, se encontró que la IL-21 era más eficaz para aumentar la proliferación de células T CD8+ purificadas a niveles subóptimos de estimulación de anti-CD3 o antígenos (datos no mostrados). Esto sugiere que IL-21 sirve como una señal accesoria que mejora la sensibilidad de las células que responden al antígeno limitante. Al igual que la IL-2, la IL-21 se fabrica mediante células T CD4+ activadas y actúa sobre células T CD8+ para potenciar su proliferación y puede contribuir a la actividad del ayudante T atribuida a las células T CD4+. De este modo, aunque la IL-21 mejora la proliferación de células T CD8+ no es tan potente como la IL-2 derivada de células T o la IL-12 derivada de macrófagos, lo que sugiere papeles no redundantes para estas citocinas.

IL-21 mejora la actividad lítica de células T efectoras CD8+.

Habiendo demostrado que IL-21 mejora la proliferación de células T CD8+, a continuación, se examinaron los efectos de IL-21 sobre la diferenciación de células T CD8+. Las células T CD8+ 2C TCR Tg se cebaron *in vitro* en presencia de la(s) citocina(s) indicada(s), luego se cosecharon y se ensayaron el número igual de células para la actividad CTL (Figura 29A). La presencia de IL-21 durante el cebado dio como resultado la generación de células T efectoras CD8+ con mayor actividad lítica sobre una base por célula que las células cebadas en ausencia de IL-21. Este aumento de la actividad lítica fue aún más pronunciado, cuando IL-2 también estaba presente durante el cebado (Figura 29B). Ninguna de estas condiciones de cebado dio como resultado la capacidad de matar células diana no específicas (datos no mostrados). De este modo, la IL-21 mejora potentemente el desarrollo de la función efectora de células T CD8+ específica de antígeno. Otras citoquinas tales como IL-12 e IL-15 también han

demostrado mejorar la diferenciación de CTL. La IL-21 se comparó con estas citocinas y fue comparable en su capacidad para inducir CTL potentes (Figura 29B).

Anteriormente, hemos mostrado que IL-21 puede aumentar el desarrollo inducido por IL-15 de la actividad lítica de NK inducida por IL-15 y CTL específica de aloantígeno. Los datos presentados en este documento, utilizando células de cebado y de diana específicas de antígeno definidas, amplían este resultado mostrando que IL-21 sola o en combinación con IL-2 puede mejorar el desarrollo de CTL a partir de células T CD8+ naïve. Varios mecanismos podrían explicar esto incluyendo aumento de la sensibilidad a los niveles de antígeno, aumento de la expresión de moléculas de adhesión o aumento de la expresión de enzimas gránulos. Los estudios están en curso para examinar estas posibilidades, los datos preliminares sugieren que la IL-21 indujo mayor expresión de ARNm de granzima A. Es importante destacar que, aunque la IL-2 era mucho más potente que la IL-21 para estimular la proliferación de células T CD8+, el cebado en presencia de IL-21 generó una actividad lítica significativamente más alta. A pesar de que comparten homología, una cadena de receptores y ambos son hechos por células T CD4+, los hallazgos presentados en este documento subrayan los papeles únicos de IL-2 e IL-21 y sugieren un papel importante para la IL-21 en la generación de respuestas de células T CD8+.

Producción de IFN gamma (o IFNg) de células T CD8+ de IL-21.

Además de la actividad de CTL, las células T efectoras CD8+ diferenciadas secretan altos niveles de IFN γ cuando se reestiman con antígeno. Por lo tanto, analizamos si la IL-21 presente durante el cebado moduló la capacidad de las células T CD8+ para producir IFN γ y lo comparó con otras citocinas que se sabe que afectan a las respuestas de células T CD8+. Las células T 2C TCR Tg fueron cebadas con antígeno/APC, IL-2 y la citocina indicada durante 5 días, a continuación, igual número de células fueron reestimuladas con mAb anti-CD3 (Figura 29C). El tratamiento con IL-21 durante el cebado de células T CD8+ dio como resultado la generación de células que producían títulos más altos de IFN γ que las células cebadas en ausencia de IL-21 (aumento de 13 veces). Utilizando dosis de citocina que generaron actividad de CTL equivalente, las células T CD8+ cebadas en presencia de IL-12 o IL-21 produjeron títulos similares de IFN γ IL-15 fue más eficaz en la inducción de IFN γ que producen células T CD8+. Como ambas IL-15 e IL-21 aumentaron de forma similar el desarrollo de la actividad lítica de células T CD8+ (Figura 29B), esta capacidad diferencial para inducir la producción de IFN gamma sugiere papeles no redundantes para las mismas citocinas relacionadas. Estos resultados son particularmente interesantes ya que recientemente se ha demostrado que IL-21 antagoniza la producción de IFN-gamma inducida por IL-12 por células T CD4+. De este modo, IL-21 juega papeles opuestos en la diferenciación de células T CD4+ y CD8+ en células productoras de IFN γ . Esto es consistente con la capacidad de las células T CD8+ para producir IFN γ de una manera independiente de IL-12/Stat4. En conclusión, la exposición a IL-21 resulta en una mayor capacidad para secretar IFN γ consistente con su papel como factor de diferenciación para células T CD8+.

Los experimentos descritos en este documento muestran que IL-21 es un potente factor de crecimiento y diferenciación para células T CD8+ que responden al antígeno. Los animales deficientes en IL-21R tienen células T CD8+ funcionales. Este hallazgo, junto con los datos presentados en este documento, implica que las respuestas de IL-21 no son necesarias para el desarrollo/mantenimiento de células T CD8+, sino más bien que la IL-21 aumenta la generación de la función efectora. Al igual que la IL-2, la IL-21 se produce mediante células T CD4+ activadas y nuestros resultados comparando las acciones de estas dos citocinas sugieren que, aunque IL-2 impulsa potentemente la proliferación de células T CD8+, IL-21 es mucho más eficaz en la promoción de la diferenciación efectora T CD8+. Recientemente, se ha demostrado que la IL-21 se produce principalmente por células Th2, lo que sugiere un mecanismo para el desarrollo de CTL productores de IFN γ durante las respuestas Th2. La IL-15 es similar a la IL-21 en su capacidad para inducir la proliferación de células naïve y el desarrollo de CTL, pero es mucho más eficaz para provocar la producción de IFN γ . Al igual que la IL-2, la IL-12 también induce fuerte proliferación de células T CD8+ y como IL-21 induce una potente actividad de CTL y producción de IFN γ . De este modo IL-2, IL-12, IL-15 y IL-21 son eficaces para mejorar diferentes aspectos de las respuestas de células T CD8+ naïve. Además, estas citocinas están hechas por diferentes tipos de células: IL-2 e IL-21 son segregadas por células T CD4+ activadas mientras IL-12 es producida por macrófagos activados e IL-15 es producida por células estromales, células endoteliales, así como macrófagos. En conjunto, esto sugiere que IL-2, IL-12, IL-15 e IL-21 actúan en fases distintas y los sitios de respuestas inmunes no son redundantes. Se ha propuesto anteriormente que la IL-21 puede ser un mediador de la transición entre la respuesta inmune innata y adaptable, los datos presentados en este documento mostrando la mejora de las respuestas de células T CD8+ apoya esta hipótesis. Dado sus potentes efectos sobre las células T CD8+, será interesante analizar el papel de la IL-21 en las respuestas de CD8+ a tumores e infecciones virales *in vivo*.

Ejemplo 11: Los macrófagos primarios expresan IL-21R y responden a IL-21 por proliferación y secreción de niveles incrementados de citocinas y quimiocinas

Este ejemplo describe el hallazgo de que IL-21 actúa como un factor de proliferación para células hematopoyéticas que específicamente promueven el crecimiento de macrófagos y células progenitoras de médula ósea.

Se examinó el efecto de la IL-21 sola y en combinación con otros factores en la modulación del crecimiento de las células hematopoyéticas. Se encontró que la IL-21 actúa como un factor de proliferación para células hematopoyéticas de ratón y humanas que específicamente promueven el crecimiento de colonias de macrófagos en

5 metilcelulosa a partir de progenitores de médula ósea murinos negativos de linaje. La IL-21 también actúa para mejorar la proliferación de células CD34+ humanas y dio como resultado una expresión aumentada del marcador específico de macrófagos CD14. Utilizando células CD14+ clasificadas de médula ósea humana, se ha demostrado mediante análisis de protección de ARNs (RPA) que la IL-21R se expresa en macrófagos, y se aumenta la expresión por TNF e IL-1 después del crecimiento en GM-CSF. De este modo, sugiriendo un papel de otras citocinas inflamatorias en la regulación de respuesta de IL-21. La expresión de la proteína del IL-21R en ratones y macrófagos humanos se ha detectado mediante el análisis FACS. La IL-21 actúa directamente sobre estas células dando como resultado la activación, el crecimiento y la secreción aumentada de quimiocinas y citocinas. En conjunto, estos resultados muestran que el complejo IL-21/IL-21R es importante para regular el crecimiento y la función de los macrófagos y para influir en las respuestas de los macrófagos en los sitios inflamatorios.

10 Equivalentes

Los expertos en el arte reconocerán, o serán capaces de comprobar utilizando no más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descrita en la presente memoria. La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Wyeth

<120> Métodos y composición para modular la actividad del receptor de la interleucina 21

<130> GI5320-PCT-P2

<140> Todavía no asignado

20 <141> 2002-10-04

<150> 09/972,218

<151> 2001-10-04

<160> 44

<170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1

<211> 2665

<212> ADN

<213> Humano

<400> 1

ES 2 629 395 T3

gtcgactgga ggcccagctg cccgtcatca gagtgacagg tcttatgaca gcctgattgg 60
 tgactcgggc tgggtgtgga ttctcacccc aggcctctgc ctgctttctc agaccctcat 120
 ctgtcacccc cacgctgaac ccagctgcca cccccagaag cccatcagac tgcccccagc 180
 acacggaatg gatttctgag aaagaagccg aaacagaagg cccgtgggag tcagcatgcc 240
 gcgtggctgg gccgccccct tgctcctgct gctgctccag ggaggctggg gctgccccga 300
 cctcgtctgc tacaccgatt acctccagac ggtcatctgc atcctggaaa tgtggaacct 360
 ccaccccagc acgctcacc ttacctggca agaccagtat gaagagctga aggacgaggc 420
 cacctcctgc agcctccaca ggtcggccca caatgccacg catgccacct acacctgcca 480
 catggatgta ttccacttca tggccgacga cattttcagt gtcaacatca cagaccagtc 540
 tggcaactac tcccaggagt gtggcagctt tctcctggct gagagcatca agccggctcc 600
 ccctttcaac gtgactgtga ccttctcagg acagtataat atctcctggc gctcagatta 660
 cgaagaccct gccttctaca tgctgaaggg caagcttcag tatgagctgc agtacaggaa 720
 ccggggagac ccctgggctg tgagtccgag gagaaagctg atctcagtgg actcaagaag 780
 tgtctccctc ctccccctgg agttccgcaa agactcgagc tatgagctgc aggtgcgggc 840
 agggcccatg cctggctcct cctaccaggg gacctggagt gaatggagtg acccggtcat 900
 ctttcagacc cagtcagagg agttaaagga aggctggaac cctcacctgc tgcttctcct 960
 cctgcttgtc atagtcttca ttctgcctt ctggagcctg aagaccatc cattgtggag 1020
 gctatggaag aagatatggg ccgtccccag ccctgagcgg ttcttcatgc ccctgtacaa 1080
 gggctgcagc ggagacttca agaaatgggt gggcgcaccc ttcactggct ccagcctgga 1140
 gctgggaccc tggagcccag aggtgcctc caccctggag gtgtacagct gccaccacc 1200
 acggagcccg gccaaagaggc tgagctcac ggagctacaa gaaccagcag agctggtgga 1260
 gtctgacggt gtgcccgaagc ccagcttctg gccgacagcc cagaactcgg ggggctcagc 1320

ES 2 629 395 T3

ttacagtgag gagagggatc ggccatacgg cctggtgtcc attgacacag tgactgtgct 1380
 agatgcagag gggccatgca cctggccctg cagctgtgag gatgacggct acccagccct 1440
 ggacctggat gctggcctgg agcccagccc aggcctagag gaccactct tggatgcagg 1500
 gaccacagtc ctgtcctgtg gctgtgtctc agctggcagc cctgggctag gaggggccct 1560
 gggaaacctc ctggacagac taaagccacc ccttgcagat ggggaggact gggctggggg 1620
 actgccctgg ggtggccggt cacctggagg ggtctcagag agtgaggcgg gctcacccct 1680
 ggccggcctg gatatggaca cgtttgacag tggctttgtg ggctctgact gcagcagccc 1740
 tgtggagtgt gacttcacca gccccgggga cgaaggacc ccccgagct acctccgcca 1800
 gtgggtggtc attcctcgc cactttcgag ccctggacc caggccagct aatgaggctg 1860
 actggatgtc cagagctggc caggccactg ggccctgagc cagagacaag gtcacctggg 1920
 ctgtgatgtg aagacacctg cagcctttgg tctcctggat gggcctttga gcctgatgtt 1980
 tacagtgtct gtgtgtgtgt gtgcatatgt gtgtgtgtgc atatgcatgt gtgtgtgtgt 2040
 gtgtgtctta ggtgcgcagt ggcattgtcca cgtgtgtgtg tgattgcacg tgctgtggg 2100
 cctgggataa tgcccatggt actccatgca ttcacctgcc ctgtgcatgt ctggactcac 2160
 ggagctcacc catgtgcaca agtgtgcaca gtaaactgtt ttgtgggtaa cagatgacaa 2220
 cagccgtcct ccctcctagg gtcttgtgtt gcaagttggt ccacagcatc tccggggctt 2280
 tgtgggatca gggcattgcc tgtgactgag gcggagccca gccctccagc gtctgcctcc 2340
 aggagctgca agaagtccat attgttcctt atcacctgcc aacaggaagc gaaaggggat 2400
 ggagtgagcc catggtgacc tcgggaatgg caatttttg ggcggccctt ggacgaaggt 2460
 ctgaatcccg actctgatac cttctggctg tgctacctga gccaaagtcgc ctcccctctc 2520
 tgggctagag tttccttacc cagacagtgg ggaaggcatg acacacctgg gggaaattgg 2580
 cgatgtcacc cgtgtacggt acgcagccca gagcagacc tcaataaacg tcagcttctc 2640
 tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaat ctaga 2665

<210> 2

<211> 538

<212> PRT

<213> Humano

<400> 2

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

ES 2 629 395 T3

Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
 85 90 95
 Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
 100 105 110
 Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
 115 120 125
 Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
 130 135 140
 Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
 145 150 155 160
 Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
 165 170 175
 Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
 180 185 190
 Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
 195 200 205
 Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
 210 215 220
 Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro His Leu Leu Leu
 225 230 235 240
 Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe Trp Ser Leu Lys
 245 250 255
 Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Val Pro Ser
 260 265 270
 Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys Ser Gly Asp Phe
 275 280 285
 Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser Leu Glu Leu Gly
 290 295 300
 Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val Tyr Ser Cys His
 305 310 315 320
 Pro Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu Thr Glu Leu Gln Glu
 325 330 335
 Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro Lys Pro Ser Phe Trp
 340 345 350
 Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp
 355 360 365
 Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Leu Asp Ala
 370 375 380
 Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro
 385 390 395 400
 Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser Pro Gly Leu Glu Asp
 405 410 415
 Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser
 420 425 430
 Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly Ser Leu Leu Asp Arg
 435 440 445

ES 2 629 395 T3

Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp Ala Gly Gly Leu Pro
 450 455 460
 Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser
 465 470 475
 Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Val Gly
 485 490 495
 Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser Pro Gly Asp
 500 505 510
 Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Ile Pro Pro
 515 520 525
 Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
 530 535

<210> 3

<211> 70

<212> PRT

5 <213> Humano

<400> 3

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

<210> 4

<211> 25

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador de PCR

<400> 4

15 gagtccgagg agaaagctga tctca 25

<210> 5

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador de PCR

<400> 5

ES 2 629 395 T3

```
gtcgacgagg cggtaccagc tgtctgcca cttctcctgt ggtgtgcctc acggtcactt 60
gcttgtctga ccgcaagtct gcccatccct ggggcagcca actggcctca gcccgtgccc 120
caggcgtgcc ctgtctctgt ctggctgccc cagccctact gtcttctctt gtgtaggctc 180
tgcccagatg cccggctggt cctcagcctc aggactatct cagcagtgac tcccctgatt 240
ctggacttgc acctgactga actcctgccc acctcaaacc ttcacctccc accaccacca 300
ctccgagtcc cgctgtgact cccacgcca ggagaccacc caagtgcccc agcctaaaga 360
atggctttct gagaaagacc ctgaaggagt aggtctggga cacagcatgc cccggggccc 420
actggctgcc ttactcctgc tgattctcca tggagcttgg agctgcctgg acctcacttg 480
ctacactgac tacctctgga ccatcacctg tgcctggag acacggagcc ccaaccccag 540
catactcagt ctcacctggc aagatgaata tgaggaactt caggaccaag agaccttctg 600
```

ES 2 629 395 T3

cagcctacac aggtctggcc acaacaccac acatatatgg tacacgtgcc atatgcgctt 660
 gtctcaattc ctgtccgatg aagttttcat tgtcaatgtg acggaccagt ctggcaacaa 720
 ctccaagag tgtggcagct ttgtcctggc tgagagcatc aaaccagctc ccccctgaa 780
 cgtgactgtg gccttctcag gacgctatga tatctcctgg gactcagctt atgacgaacc 840
 ctccaactac gtgctgaggg gcaagctaca atatgagctg cagtatcgga acctcagaga 900
 cccctatgct gtgaggccgg tgaccaagct gatctcagtg gactcaagaa acgtctctct 960
 tctccctgaa gagttccaca aagattctag ctaccagctg cagggtgctgg cagcgcctca 1020
 gccaggcact tcattcaggg ggacctggag tgagtggagt gaccccgta tctttcagac 1080
 ccaggctggg gagcccgagg caggctggga ccctcacatg ctgctgctcc tggctgtctt 1140
 gatcattgtc ctggttttca tgggtctgaa gatccacctg ccttgagggc tatggaaaaa 1200
 gatatgggca ccagtgccca cccctgagag tttcttcag cccctgtaca gggagcacag 1260
 cggaacttc aagaaatggg ttaatacccc tttcacggcc tccagcatag agttggtgcc 1320
 acagagtcc acaacaacat cagccttaca tctgtcattg tatccagcca aggagaagaa 1380
 gttcccgggg ctgccgggtc tggaagagca actggagtgt gatggaatgt ctgagcctgg 1440
 tcaactggtc ataatcccct tggcagctgg ccaagcggtc tcagcctaca gtgaggagag 1500
 agaccggcca tatggtctgg tgtccattga cacagtgact gtgggagatg cagaggcctt 1560
 gtgtgtctgg ccctgtagct gtgaggatga tggctatcca gccatgaacc tggatgctgg 1620
 ccgagagtct ggccctaatt cagaggatct gctcttggtc acagaccctg cttttctgtc 1680
 ttgcggtgtg gtctcaggtg gtggtctcag gcttgagggc tcccaggca gcctactgga 1740
 caggttgagg ctgtcatttg caaaggaagg ggactggaca gcagaccca cctggagaac 1800
 tgggtcccca ggagggggct ctgagagtga agcaggttcc ccccctggtc tggacatgga 1860
 cacatttgac agtggctttg caggttcaga ctgtggcagc cccgtggaga ctgatgaagg 1920
 accccctcga agctatctcc gccagtgggt ggtcaggacc cctccacctg tggacagtgg 1980
 agcccagagc agctagcata taataaccag ctatagttag aagaggcctc tgagcctggc 2040
 atttacagtg tgaacatgta ggggtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 2100
 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtcttgggt tgtgtgttag cacatccatg ttgggatttg 2160
 gtctgttgtc atgtattgta atgctaaatt ctctaccaa agttctaggc ctacgagtga 2220
 attctcatgt ttacaaactt gctgtgtaaa ccttgttctt taatttaata ccattgggta 2280
 aataaaattg gctgcaacca attactggag ggattagagg tagggggctt ttgagttacc 2340
 tgtttggaga tggagaagga gagaggagag accaagagga gaaggaggaa ggagaggaga 2400
 ggagaggaga ggagaggaga ggagaggaga ggagaggaga ggagaggaga ggctgccgtg 2460
 aggggagagg gaccatgagc ctgtggccag gagaaacagc aagtatctgg ggtacactgg 2520
 tgaggagggt gccaggccag cagttagaag agtagattag gggtgacctc cagtatttgt 2580
 caaagccaat taaataaca aaaaaaaaaa aaaagcggcc gctctaga 2628

<210> 10

<211> 529

<212> PRT

<213> Ratón

<400> 10

ES 2 629 395 T3

Met Pro Arg Gly Pro Val Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ile Leu His Gly
1 5 10 15
Ala Trp Ser Cys Leu Asp Leu Thr Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr
20 25 30
Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser
35 40 45
Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr Glu Glu Leu Gln Asp Gln Glu Thr Phe
50 55 60
Cys Ser Leu His Arg Ser Gly His Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr
65 70 75 80
Cys His Met Arg Leu Ser Gln Phe Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val
85 90 95
Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly Asn Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
100 105
Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val
115 120 125
Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu
130 135 140
Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145 150 155 160
Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile
165 170 175
Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys
180 185
Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr
195 200 205
Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
210 215 220
Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Pro His Met Leu Leu
225 230 235 240
Leu Leu Ala Val Leu Ile Ile Val Leu Val Phe Met Gly Leu Lys Ile
245 250 255
His Leu Pro Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Pro Val Pro Thr
260 265 270
Pro Glu Ser Phe Phe Gln Pro Leu Tyr Arg Glu His Ser Gly Asn Phe
275 280 285
Lys Lys Trp Val Asn Thr Pro Phe Thr Ala Ser Ser Ile Glu Leu Val
290 295 300
Pro Gln Ser Ser Thr Thr Thr Ser Ala Leu His Leu Ser Leu Tyr Pro
305 310 315 320
Ala Lys Glu Lys Lys Phe Pro Gly Leu Pro Gly Leu Glu Glu Gln Leu
325 330 335

ES 2 629 395 T3

Glu Cys Asp Gly Met Ser Glu Pro Gly His Trp Cys Ile Ile Pro Leu
 340 345 350
 Ala Ala Gly Gln Ala Val Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro
 355 360 365
 Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Gly Asp Ala Glu Gly
 370 375 380
 Leu Cys Val Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Met
 385 390 395 400
 Asn Leu Asp Ala Gly Arg Glu Ser Gly Pro Asn Ser Glu Asp Leu Leu
 405 410 415
 Leu Val Thr Asp Pro Ala Phe Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser Gly Ser
 420 425 430
 Gly Leu Arg Leu Gly Gly Ser Pro Gly Ser Leu Leu Asp Arg Leu Arg
 435 440 445
 Leu Ser Phe Ala Lys Glu Gly Asp Trp Thr Ala Asp Pro Thr Trp Arg
 450 455 460
 Thr Gly Ser Pro Gly Gly Gly Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser Pro Pro
 465 470 475
 Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Ala Gly Ser Asp Cys
 485 490 495
 Gly Ser Pro Val Glu Thr Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg
 500 505
 Gln Trp Val Val Arg Thr Pro Pro Val Asp Ser Gly Ala Gln Ser
 515 520 525
 Ser

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador de PCR

<400> 11

agcatcaagc cggctcccc 20

10 <210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Cebador artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador de PCR

<400> 12

ctccattcac tccaggtccc 20

<210> 13

<211> 20

- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador de PCR
- 5 <400> 13
- ttgaacgtga ctgtggcctt 20
- <210> 14
- <211> 20
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido interno de ADNc MU-1 de murino
- <400> 14
- tgaatgaagt gcctggctga 20
- 15 <210> 15
- <211> 40
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador de PCR 5'
- <400> 15
- cacaaagctt cagtatgagc tgcagtacag gaaccgggga 40
- <210> 16
- <211> 40
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: cebador de PCR 3'
- <400> 16
- 30 cacagatcc cttaactcc tctgactggg tctgaaagat 40
- <210> 17
- <211> 224
- <212> PRT
- <213> Organismo desconocido
- 35 <220>
- <221> Organismo desconocido

ES 2 629 395 T3

<222> (1)..(224)

<223> Descripción de organismo desconocido: segundo polipéptido que comprende una región Fc

<400> 17

```

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

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 65      70      75      80
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 85      90      95
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile Glu Lys Thr
 100     105     110
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 115     120     125
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 130     135     140
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 145     150     155     160
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 165     170     175
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 180     185     190
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 195     200     205
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210     215     220

```

<210> 18

<211> 617

<212> ADN

<213> Humano

<400> 18

ES 2 629 395 T3

gctgaagtga aaacgagacc aaggcttagc tctactgttg gtacttatga gatccagtcc 60
 tggcaacatg gagaggattg tcatctgtct gatggtcatc ttcttgggga cactgggtcca 120
 caaatcaagc tccaaggtc aagatcgcca catgattaga atgctgcaac ttatagatat 180
 tgttgatcag ctgaaaaatt atgtgaatga cttggtcctt gaatttctgc cagctccaga 240
 agatgtagag acaaactgtg agtggtcagc ttttctctgc tttcagaagg cccaactaaa 300
 gtcagcaaat acaggaaca atgaaaggat aatcaatgta tcaattaaaa agctgaagag 360
 gaaaccacct tccacaaatg cagggagaag acagaaacac agactaacat gcccttcctg 420
 tgattcttat gagaaaaaac cacccaaaga attcctagaa agattcaaat cacttctcca 480
 aaagatgatt catcagcatc tgtcctctag aacacacgga agtgaagatt cctgaggatc 540
 taacttgacg ttggacacta tgttacatac tctaatatag tagtgaaagt catttctttg 600
 tattccaagt ggaggag 617

<210> 19

<211> 162

<212> PRT

5 <213> Humano

<400> 19

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

<210> 20

<211> 7

10 <212> PRT

ES 2 629 395 T3

<213> Humano

<400> 20

Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala
1 5

<210> 21

5 <211> 16

<212> PRT

<213> Humano

<400> 21

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ser Pro Leu His Pro
1 5 10 15

10 <210> 22

<211> 786

<212> ADN

<213> Humano

<400> 22

```

atgaaattct tagtcaacgt tgcccttgtt tttatggtcg tgtacatttc ttacatctat    60
gccggcagcg gacaccacca tcatcaccac ggtagcggcg actataaaga cgatgacgat    120
aagggttccg gatgccccga cctcgtctgc tacaccgatt acctccagac ggtcatctgc    180
atcctggaaa tgtggaacct ccaccccagc acgetcacc ttacctggca agaccagtat    240
gaagagctga aggacgaggc cacctcctgc agcctccaca ggtcggccca caatgccacg    300

catgccacct acacctgcca catggatgta ttccacttca tggccgacga cattttcagt    360
gtcaacatca cagaccagtc tggcaactac tcccaggagt gtggcagctt tctcctggct    420
gagagcatca agccggctcc ccctttcaac gtgactgtga ccttctcagg acagtataat    480
atctcctggc gctcagatta cgaagacct gccttctaca tgctgaaggg caagcttcag    540
tatgagctgc agtacaggaa ccggggagac ccctgggctg tgagtccgag gagaaagctg    600
atctcagtgg actcaagaag tgtctccctc ctccccctgg agttccgcaa agactcgagc    660
tatgagctgc aggtgctggc agggcccatg cctggctcct cctaccaggg gacctggagt    720
gaatggagtg acccggtcac ctttcagacc cagtcagagg agttaaagga aggctggaac    780
taatga                                           786
    
```

15

<210> 23

<211> 260

<212> PRT

<213> Humano

20 <400> 23

ES 2 629 395 T3

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
 1 5 10 15
 Ser Tyr Ile Tyr Ala Gly Ser Gly His His His His His His Gly Ser
 20 25 30
 Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Cys Pro Asp Leu
 35 40 45
 Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met
 50 55 60
 Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr
 65 70 75 80
 Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala
 85 90 95
 His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His
 100 105 110
 Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly
 115 120 125
 Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys
 130 135 140
 Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn
 145 150 155 160
 Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys
 165 170 175
 Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp
 180 185 190
 Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val
 195 200 205
 Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln
 210 215 220
 Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser
 225 230 235 240
 Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys
 245 250 255
 Glu Gly Trp Asn
 260

<210> 24

<211> 1426

<212> ADN

<213> Humano

<400> 24

ES 2 629 395 T3

```

gcgggccgac caccatgccg cgtggctggg cgcgccctt gtcctgctg ctgctccagg 60
gaggctgggg ctgccccgac ctcgtctgct acaccgatta cctccagacg gtcctctgca 120
tcctggaaat gtggaacctc caccagca cgctcaccct tacctggcaa gaccagtatg 180
aagagctgaa ggacgaggcc acctcctgca gcctccacag gtcggccac aatgccacgc 240
atgccaccta cacctgccac atggatgtat tccacttcat ggccgacgac attttcagtg 300
tcaacatcac agaccagtct ggcaactact cccaggagtg tggcagcttt ctctggctg 360
agagcatcaa gccggctccc ctttcaacg tgactgtgac cttctcagga cagtataata 420
tctctggcg ctgagattac gaagacctg cttctacat gctgaagggc aagcttcagt 480
atgagctgca gtacaggaac cggggagacc cctgggctgt gagtccgagg agaaagctga 540
tctcagtgga ctcaagaagt gtctccctcc tccccctgga gtccgcaa gactcgagct 600
atgagctgca ggtgcgggca gggcccatgc ctggctcctc ctaccagggg acctggagtg 660
aatggagtga cccggtcatc tttcagacc agtcagagga gttaaaggaa ggctggaacg 720
gctccggctc tagagacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcctgg 780
ggggaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctccgga 840
cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca 900
actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt 960
acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg 1020
gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agtccccatc gagaaaacca 1080
tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg 1140
aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg 1200
acatcgcctg ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc 1260
ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca 1320
ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact 1380
acacgcagaa gagcctctcc ctgtccccgg gtaaagtgtg gaattc 1426

```

<210> 25

<211> 467

<212> PRT

<213> Humano

<400> 25

ES 2 629 395 T3

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
 1 5 10 15
 Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
 20 25 30
 Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
 35 40 45
 Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
 50 55 60
 Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
 65 70 75 80
 Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
 85 90 95
 Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
 100 105 110
 Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
 115 120 125
 Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
 130 135 140
 Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
 145 150 155 160
 Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
 165 170 175
 Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
 180 185 190
 Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
 195 200 205
 Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
 210 215 220
 Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Gly Ser Gly Ser Arg
 225 230 235 240
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile
 340 345 350

ES 2 629 395 T3

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Pro Gly Lys
 465

<210> 26

<211> 1499

<212> ADN

<213> Humano

<400> 26

ES 2 629 395 T3

gcggccgcac caccatgccg cgtggctggg ccgccccctt gctcctgctg ctgctccagg 60
 gaggctgggg ctgccccgac ctcgtctgct acaccgatta cctccagacg gtcctctgca 120
 tcctggaaat gtggaacctc caccacagca cgctcaccct tacctggcaa gaccagtatg 180
 aagagctgaa ggacgaggcc acctcctgca gcctccacag gtcggcccac aatgccacgc 240
 atgccaccta cacctgccac atggatgtat tccacttcat ggccgacgac attttcagtg 300
 tcaacatcac agaccagtct ggcaactact cccaggagtg tggcagcttt ctcctggctg 360
 agagcatcaa gccggctccc ctttcaacg tgactgtgac cttctcagga cagtataata 420
 tctcctggcg ctcagattac gaagacctg ctttctacat gctgaagggc aagcttcagt 480
 atgagctgca gtacaggaac cggggagacc cctgggctgt gagtccgagg agaaagctga 540
 tctcagtgga ctcaagaagt gtctccctcc tccccctgga gttccgcaa gactcgagct 600
 atgagctgca ggtgcgggca gggcccatgc ctggctctc ctaccagggg acctggagtg 660
 aatggagtga cccggtcatc tttcagacc agtcagagga gttaaaggaa ggctggaacg 720
 gctccggctc tagagacaaa actcacacat gccaccctg cccagcacct gaactcctgg 780
 ggggaccgtc agtcttctc tcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga 840
 cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca 900
 actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt 960
 acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg 1020
 gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agtccccatc gagaaaacca 1080
 tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg 1140

 aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggctt tatcccagcg 1200
 acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc 1260
 ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca 1320
 ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact 1380
 acacgcagaa gagcctctcc ctgtccccgg gtaaatacagg aatggcatca atgacaggag 1440
 gtcaacaaat gggttctgga tctcatcatc atcatcatca ttctggaggt tgagaattc 1499

<210> 27

<211> 492

<212> PRT

<213> Humano

<400> 27

ES 2 629 395 T3

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
1 5 10 15
Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
20 25 30
Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
35 40 45
Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
50 55 60
Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
65 70 75 80
Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
85 90 95
Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
100 105 110
Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
115 120 125
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
130 135 140
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145 150 155 160
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
165 170 175
Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
180 185 190
Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
195 200 205
Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
210 215 220
Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Gly Ser Gly Ser Arg
225 230 235 240
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

ES 2 629 395 T3

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Val Pro Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Pro Gly Lys Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly
 465 470 475 480
 Ser Gly Ser His His His His His His Ser Gly Gly
 485 490

<210> 28

<211> 1426

<212> ADN

<213> Humano

<400> 28

ES 2 629 395 T3

gcggccgcac caccatgccg cgtggctggg ccgccccctt gtcctgctg ctgctccagg 60
 gaggctgggg ctgccccgac ctcgtctgct acaccgatta cctccagacg gtcctctgca 120
 tcctggaaat gtggaacctc caccccagca cgctcaccct tacctggcaa gaccagtatg 180
 aagagctgaa ggacgaggcc acctcctgca gcctccacag gtcggcccac aatgccacgc 240
 atgccaccta cacctgccac atggatgtat tccacttcat ggccgacgac attttcagtg 300
 tcaacatcac agaccagtct ggcaactact cccaggagtg tggcagcttt ctcttgctg 360
 agagcatcaa gccggctccc cttttcaacg tgactgtgac cttctcagga cagtataata 420
 tctcctggcg ctacagattac gaagaccctg ctttctacat gctgaagggc aagcttcagt 480
 atgagctgca gtacaggaac cggggagacc cctgggctgt gagtccgagg agaaagctga 540

 tctcagtgga ctcaagaagt gtctccctcc tccccctgga gttccgaaa gactcgagct 600
 atgagctgca ggtgcgggca gggcccatgc ctggctcctc ctaccagggg acctggagtg 660
 aatggagtga cccggtcatc tttcagacc agtcagagga gttaaaggaa ggctggaacg 720
 gctccggctc tagagacaaa actcacacat gccaccctg cccagcacct gaagccctgg 780
 gggcaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga cacctcatg atctcccgga 840
 cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca 900
 actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcg gaggagcagt 960
 acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg 1020
 gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca 1080
 tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg 1140
 aggagatgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg 1200
 acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc 1260
 ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctatagcaa gtcaccctg gacaagagca 1320
 ggtggcagca ggggaaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact 1380
 acacgcagaa gagcctctcc ctgtccccgg gtaaattgagt gaattc 1426

<210> 29

<211> 467

<212> PRT

<213> Humano

<400> 29

ES 2 629 395 T3

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

ES 2 629 395 T3

Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
 165 170 175
 Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
 180 185
 Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
 195 200 205
 Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
 210 215 220
 Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Gly Ser Gly Ser Arg
 225 230 235
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly
 245 250 255
 Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Pro Gly Lys
 465

<210> 30

<211> 741

<212> ADN

<213> Humano

<400> 30

ES 2 629 395 T3

```

atgccgcgtg gctgggccgc ccccttgctc ctgctgctgc tccagggagg ctggggctgc      60
cccgacctcg tctgctacac cgattacctc cagacgggtca tctgcatcct ggaaatgtgg      120
aacctccacc ccagcacgct cacccttacc tggcaagacc agtatgaaga gctgaaggac      180
gaggccacct cctgcagcct ccacaggtcg gccacaatg ccacgcatgc cacctacacc      240
tgccacatgg atgtattcca ctcatggcc gacgacattt tcagtgtcaa catcacagac      300
cagtctggca actactccca ggagtgtggc agctttctcc tggctgagag catcaagccg      360
gctccccctt tcaacgtgac tgtgacctc tcaggacagt ataatatctc ctggcgctca      420
gattacgaag accctgcctt ctacatgctg aagggcaagc ttcagtatga gctgcagtac      480
aggaaccggg gagaccctg ggctgtgagt ccgaggagaa agctgatctc agtggactca      540
agaagtgtct ccctcctccc cctggagttc cgcaaagact cgagctatga gctgcaggtg      600
cgggcagggc ccatgcctgg ctctcctac caggggacct ggagtgaatg gagtgaccgg      660
gtcatctttc agaccagtc agaggagtta aaggaaggct ggaacaaaac cgaaacctcc      720
caggttgctc cggcataatg a                                     .      741

```

<210> 31

<211> 245

<212> PRT

<213> Humano

<400> 31

```

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

```

ES 2 629 395 T3

Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
 145 150 155 160
 Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
 165 170 175
 Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
 180 185 190
 Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
 195 200 205
 Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
 210 215 220
 Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Lys Thr Glu Thr Ser
 225 230 235 240
 Gln Val Ala Pro Ala
 245

<210> 32

<211> 1413

<212> ADN

<213> Humano

<400> 32

ES 2 629 395 T3

```

atgccgctg gctgggccgc ccccttctc ctgctgctgc tccagggagg ctggggctgc      60
cccgacctcg tctgctacac cgattacctc cagacggcca tctgcatcct ggaaatgtgg     120
aacctccacc ccagcacgct cacccttacc tggcaagacc agtatgaaga gctgaaggac     180
gaggccacct cctgcagcct ccacaggtcg gcccaaatg ccacgcatgc cacctacacc     240
tgccacatgg atgtattcca cttcatggcc gacgacattt tcagtgtcaa catcacagac     300
cagtctggca actactccca ggagtgtggc agctttctcc tggctgagag catcaagccg     360
gctccccctt tcaacgtgac tgtgacctc tcaggacagt ataatatctc ctggcgtca      420
gattacgaag accctgcctt ctacatgctg aagggcaagc ttcagtatga gctgcagtac     480
aggaaccggg gagaccctcg ggctgtgagt ccgaggagaa agctgatctc agtggactca     540
agaagtgtct ccctcctccc cctggagttc cgcaaagact cgagctatga gctgcaggtg     600
cgggcagggc ccatgcctgg ctctcctac caggggacct ggagtgaatg gagtgacccg     660
gtcatctttc agaccagtc agaggagtta aaggaaggct ggaacgatga cgatgacaag     720
ggctccggcg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaagc cctgggggca     780
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacacct tcatgatctc ccggaccct      840
gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg     900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac     960
agcagctacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag    1020
gagtacaagt gcaaggctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc    1080
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccggggaggag    1140
atgaccaaga accaggctcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc    1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg    1260

ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg    1320
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg    1380
cagaagagcc tctcctgtc cccgggtaaa tga                                     1413

```

<210> 33

<211> 470

<212> PRT

<213> Humano

<400> 33

ES 2 629 395 T3

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gln Gly
1 5 10 15
Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Gln Thr
20 25 30
Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His Pro Ser Thr Leu Thr
35 40 45
Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys Asp Glu Ala Thr Ser
50 55 60
Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr His Ala Thr Tyr Thr
65 70 75 80
Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp Asp Ile Phe Ser Val
85 90 95
Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
100 105 110
Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Phe Asn Val Thr Val
115 120 125
Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg Ser Asp Tyr Glu Asp
130 135 140
Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145 150 155 160
Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro Arg Arg Lys Leu Ile
165 170 175
Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu Glu Phe Arg Lys
180 185 190
Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro Met Pro Gly Ser
195 200 205
Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
210 215 220
Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Asp Asp Asp Asp Lys
225 230 235 240
Gly Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
245 250 255
Ala Leu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
260 265 270
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
275 280 285
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
290 295 300

ES 2 629 395 T3

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 370 375 380
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 34

<211> 1754

<212> ADN

<213> Ratón

<400> 34

ES 2 629 395 T3

atgccccggg gccagtggc tgccttactc ctgctgatte tccatggagc ttggagctgc	60
ctggacctca cttgctacac tgactacctc tggaccatca cctgtgtcct ggagacacgg	120
agccccaacc ccagcatact cagtctcacc tggcaagatg aatatgagga acttcaggac	180
caagagacct tctgcagcct acacaggtct ggccacaaca ccacacatat atggtacacg	240
tgccatatgc gcttgtctca attcctgtcc gatgaagttt tcattgtcaa tgtgacggac	300
cagtctggca acaactccca agagtgtggc agctttgtcc tggctgagag catcaaacca	360
gctccccct tgaacgtgac tgtggccttc tcaggacgct atgatatctc ctgggactca	420
gcttatgacg aaccctccaa ctacgtgctg aggggcaagc tacaatatga gctgcagtat	480
cggaacctca gagacccta tgctgtgagg ccggtgacca agctgatctc agtggactca	540
agaaacgtct ctcttctccc tgaagagttc cacaagatt ctagctacca gctgcaggtg	600
cgggcagcgc ctacgccagg cacttcattc agggggacct ggagtgagtg gagtgacccc	660
gtcatctttc agaccaggc tggggagccc gaggcaggct gggacggctc cggctctaga	720
gagccccgcg gaccgacaat caagccctgt cctccatgca aatgcccagg taagtacta	780
gaccagagct ccaactcccg gagaatggta agtgctataa acatccctgc actagaggat	840
aagccatgta cagatccatt tccatctctc ctcatcagca cctaacctcg aggggtggacc	900
atccgtcttc atcttccctc caaagatcaa ggatgtactc atgatctccc tgagccccat	960
agtcacatgt gtggtggtgg atgtgagcga ggatgaccca gatgtccaga tcagctggtt	1020
tgtgaacaac gtggaagtac acacagctca gacacaaacc catagagagg attacaacag	1080
tactctccgg gtggtcagtg ccctcccat ccagcaccag gactggatga gtggcaaggc	1140
tttcgcatgc gccgtcaaca acaaagacct cccagcgcctc atcgagagaa ccatctcaa	1200
acccaaagggt gagagctgca gcctgactgc atgggggctg ggatgggcat aaggataaag	1260
gtctgtgtgg acagccttct gcttcagcca tgacctttgt gtatgtttct accctcacag	1320
ggtcagtaag agctccacag gtatatgtct tgcctccacc agaagaagag atgactaaga	1380
aacaggtcac tctgacctgc atggtcacag acttcatgcc tgaagacatt tacgtggagt	1440
ggaccaacaa cgggaaaaca gagctaaact acaagaacac tgaaccagtc ctggactctg	1500
atggttctta cttcatgtac agcaagctga gagtgaaaa gaagaactgg gtggaagaa	1560
atagctactc ctgttcagtg gtccacgagg gtctgcacaa tcaccacacg actaagagct	1620
tctccccggac tccgggtaaa tgagctcagc acccacaana ctctcaggtc caaagagaca	1680
cccacactca tctccatgct tcccttgtat aaataaagca cccagcaatg cctgggacca	1740
tgtaatagga attc	1754

<210> 35

<211> 240

<212> PRT

<213> Ratón

<400> 35

ES 2 629 395 T3

Met Pro Arg Gly Pro Val Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ile Leu His Gly
 1 5 10 15
 Ala Trp Ser Cys Leu Asp Leu Thr Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr
 20 25 30
 Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser
 35 40 45
 Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr Glu Glu Leu Gln Asp Gln Glu Thr Phe
 50 55 60
 Cys Ser Leu His Arg Ser Gly His Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr
 65 70 75 80
 Cys His Met Arg Leu Ser Gln Phe Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val
 85 90 95
 Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly Asn Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
 100 105 110
 Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val
 115 120 125
 Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu
 130 135 140
 Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
 145 150 155 160
 Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile
 165 170 175
 Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys
 180 185 190
 Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr
 195 200 205
 Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
 210 215 220
 Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Gly Ser Gly Ser Arg
 225 230 235 240

<210> 36

<211> 795

<212> ADN

<213> Ratón

<400> 36

ES 2 629 395 T3

```

ctgcaggctg acaccacat gccccggggc ccagtggctg ccttactcct gctgattctc    60
catggagctt ggagctgcct ggacctcact tgctacactg actacctctg gaccatcacc    120
tgtgtcctgg agacacggag ccccaacccc agcatactca gtctcacctg gcaagatgaa    180
tatgaggaac ttcaggacca agagaccttc tgcagcctac acaggtctgg ccacaacacc    240
acacatatat ggtacacgtg ccatatgcgc ttgtctcaat tcctgtccga tgaagttttc    300
attgtcaatg tgacggacca gtctggcaac aactcccaag agtgtggcag ctttgtcctg    360
gctgagagca tcaaaccagc tcccccttg aacgtgactg tggccttctc aggacgctat    420
gatatctcct gggactcagc ttatgacgaa ccctccaact acgtgctgag gggcaagcta    480
caatatgagc tgcagtatcg gaacctcaga gaccctatg ctgtgaggcc ggtgaccaag    540
ctgatctcag tggactcaag aaacgtctct cttctccctg aagagttcca caaagattct    600
agctaccagc tgcaggtgcg ggcagcgctt cagccaggca cttcattcag ggggacctgg    660
agtgagtgga gtgacccccgt catctttcag acccaggctg gggagcccga ggcaggctgg    720
gacggcagcg gacaccacca tcatcaccac ggtagcggcg actataaaga cgatgacgat    780
aagtagtgag aattc                                                    795

```

<210> 37

<211> 255

<212> PRT

<213> Ratón

<400> 37

```

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

```

ES 2 629 395 T3

Cys Ser Leu His Arg Ser Gly His Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr
65 70 75 80
Cys His Met Arg Leu Ser Gln Phe Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val
85 90 95
Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly Asn Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
100 105 110
Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val
115 120 125
Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu
130 135 140
Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145 150 155 160
Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile
165 170 175
Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys
180 185 190
Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr
195 200 205
Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
210 215 220
Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Gly Ser Gly His His
225 230 235 240
His His His His Gly Ser Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
245 250 255

<210> 38

<211> 792

<212> ADN

<213> Ratón

<400> 38

```

atgaaattct tagtcaacgt tgcccttggt tttatggctg tgtacatttc ttacatctat      60
gccggcagcg gacaccacca tcatcaccac ggtagcggcg actataaaga cgatgacgat      120
aagggttccg gatgcctgga cctcacttgc tacactgact acctctggac catcacctgt      180
gtcctggaga cacggagccc caaccccagc atactcagtc tcacctggca agatgaatat      240
gaggaacttc aggaccaaga gaccttctgc agcctacaca ggtctggcca caacaccaca      300
catatatggt acacgtgcca tatgcgcttg tctcaattcc tgtccgatga agttttcatt      360
gtcaatgtga cggaccagtc tggcaacaac tccaagagt gtggcagctt tgtcctggct      420
gagagcatca aaccagctcc ccccttgaac gtgactgtgg ccttctcagg acgctatgat      480
atctcctggg actcagctta tgacgaacc tccaactacg tgctgagggg caagctacaa      540
tatgagctgc agtatcggaa cctcagagac ccctatgctg tgaggccggt gaccaagctg      600
atctcagtggt actcaagaaa cgtctctctt ctccctgaag agttccacaa agattctagc      660
taccagctgc aggtgcgggc agcgcctcag ccaggcactt cattcagggg gacctggagt      720
gagtggagtg accccgtcat ctttcagacc caggctgggg agcccaggc aggctgggac      780

tagtgagaat tc                                                                792

```

ES 2 629 395 T3

<210> 39
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> Ratón
 <400> 39

Met Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile
 1 5 10 15
 Ser Tyr Ile Tyr Ala Gly Ser Gly His His His His His His Gly Ser
 20 25 30
 Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ser Gly Cys Leu Asp Leu
 35 40 45
 Thr Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr
 50 55 60
 Arg Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr
 65 70 75 80
 Glu Glu Leu Gln Asp Gln Glu Thr Phe Cys Ser Leu His Arg Ser Gly
 85 90 95
 His Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr Cys His Met Arg Leu Ser Gln
 100 105 110
 Phe Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly
 115 120 125
 Asn Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys
 130 135 140
 Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp
 145 150 155 160
 Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg
 165 170 175
 Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr
 180 185 190
 Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Asn Val
 195 200 205
 Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln
 210 215 220
 Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser
 225 230 235 240
 Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu
 245 250 255
 Ala Gly Trp Asp
 260

<210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Ratón
 <400> 40

Ser Val Tyr Asp Phe Phe Val Trp Leu
 1 5

ES 2 629 395 T3

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Ratón

5 <400> 41

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5

<210> 42

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebador de PCR 5'

<400> 42

gcctctcag gacgctatga t 21

15 <210> 43

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador de PCR 5'

<400> 43

ccctacagca cgtagtgga 20

<210> 44

<211> 26

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Sonda de PCR

<400> 44

30 tctgggact cagcttatga cgaacc 26

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-IL-21 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para uso en el tratamiento o prevención de un trastorno artrítico en un sujeto.
- 5 2. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo anti-IL-21 o fragmento de unión al antígeno del mismo se administra en combinación con un agente terapéutico adicional.
- 10 3. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso según la reivindicación 2, en el que el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de citocina, un inhibidor del factor de crecimiento, un inmunosupresor, un agente antiinflamatorio, un inhibidor metabólico, un inhibidor enzimático, un agente citotóxico y un agente citostático.
- 15 4. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento o prevención de un trastorno artrítico en un sujeto, en el que la composición farmacéutica comprende
 - (i) un anticuerpo anti-IL-21 o un fragmento de unión al antígeno del mismo en un portador farmacéuticamente aceptable, o
 - 15 (ii) un anticuerpo anti-IL-21 o un fragmento de unión al antígeno del mismo y un agente terapéutico adicional seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de citocina, un inhibidor del factor de crecimiento, un inmunosupresor, un agente antiinflamatorio, un inhibidor metabólico, un inhibidor enzimático, un agente citotóxico y un agente citostático, en un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 5. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 4, o el anticuerpo anti-IL-21 o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso según la reivindicación 2, en el que el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en un antagonista de TNF, un antagonista de IL-12, un antagonista de IL-15, un antagonista de IL-17, un antagonista de IL-18, un antagonista de IL-22, un agente de agotamiento de células T, un agente de agotamiento de células B, metotrexato, leflunomida, sirolimus (rapamicina) o un análogo del mismo, un inhibidor de Cox-2, un inhibidor de cPLA2, un NSAID y un inhibidor de p38.
- 25 6. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, o el anticuerpo anti-IL-21 o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso según la reivindicación 5, en el que el antagonista de TNF es un fragmento soluble de un receptor de TNF.
- 30 7. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, o el anticuerpo anti-IL-21 o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que el antagonista de TNF es una proteína de fusión de IgG del receptor de TNF humano p75.
- 35 8. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, o el anticuerpo anti-IL-21 o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso según la reivindicación 5, en el que el agente terapéutico adicional es un antagonista de IL-15.
9. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, o el anticuerpo anti-IL-21 o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso según la reivindicación 5, en el que el agente terapéutico adicional es metotrexato o leflunomida.
- 40 10. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 5, o el anticuerpo anti-IL-21 o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso según la reivindicación 5, en el que el análogo de rapamicina es CCI-779.
11. El anticuerpo anti-IL-21 o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, 5-10, o la composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, en el que el trastorno artrítico se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, osteoartritis, artritis psoriásica y espondilitis anquilosante.
- 45 12. El anticuerpo anti-IL-21 o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, 5-11, o la composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-11, en la que el anticuerpo anti-IL-21 es un anticuerpo monoclonal o de especificidad única.
13. El anticuerpo anti-IL-21 o fragmento de unión al antígeno del mismo para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, 5-12, o la composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-12, en la que el anticuerpo anti-IL-21 es un anticuerpo humano, humanizado, quimérico o neutralizante.

FIG.1

1 GTCGACGCGS~CGGTACCAGC TGTCTGCCCA CTTCTCCTGT GGTGTGCCTC
 51 ACGGTCACCTT GCTTGTCTGA CCGCAAGTCT GCCCATCCCT GGGGCAGCCA
 101 ACTGGCCTCA GCCCCTGCCC CAGGCGTGCC CTGTCTCTGT CTGGCTGCCC
 151 CAGCCCTACT GTCTTCTCT GTGTAGGCTC TGCCCAGATG CCOGGCTGGT
 201 CCTCAGCCTC AGGACTATCT CAGCAGTGAC TCCCCTGATT CTGGACTTGC
 251 ACCTGACTGA ACTCCTGCCC ACCTCAAACC TTCACCTCCC ACCACCACCA
 301 CTCCGAGTCC CGCTGTGACT CCCACGCCCA GGAGACCACC CAAGTGCCCC
 351 AGCCTAAAGA ATGGCTTTCT GAGAAAGACC CTGAAGGAGT AGGTCTGGGA
 401 CACAGCATGC CCCGGGGCCC AGTGGCTGCC TTA CTCTCTGC TGATTCTCCA
 451 TGAGACTTGG AGCTGCCTGG ACCTCACTTG CTACACTGAC TACCTCTGGA
 501 CCATCACCTG TGTCCTGGAG ACACGGAGCC CCAACCCAG CATACTCAGT
 551 CTCACCTGGC AAGATGAATA TGAGGAACTT CAGGACCAAG AGACCTTCTG
 601 CAGCCTACAC AGGTCTGGCC ACAACACCAC ACATATATGG TACACGTGCC
 651 ATATGCGCTT GTCTCAATTC CTGTCCGATG AAGTTTTCAT TGTCATGTG
 701 ACGGACCAGT CTGGCAACAA CTCCAAGAG TGTGGCAGCT TTGTCTTGGC
 751 TGAGAGCATC AAACCAGCTC CCCCTTGAA CGTACTGTG GCCTTCTCAG
 801 GACGCTATGA TATCTCTGG GACTCAGCTT ATGACGAACC CTCCA TACTC
 851 GTGCTGAGGG GCAAGCTACA ATATGAGCTG CAGTATCGGA ACCTCAGAGA
 901 CCCCTATGCT GTGAGGCCGG TGACCAAGCT GATCTCAGTG GACTCAAGAA
 951 ACGTCTCTCT TCTCCCTGAA GAGTCCACA AAGATTTCTAG CTACCAGCTG
 1001 CAGGTGCGGG CAGCGCCTCA GCCAGGCACT TCATTCAGGG GGACCTGGAG
 1051 TGAGTGGAGT GACCCCGTCA TCTTCAGAC CCAGGCTGGG GAGCCCGAGG
 1101 CAGGCTGGGA CCCTCACATG CTGCTGCTCC TGGCTGTCTT GATCATTGTC
 1151 CTGGTTTTCA TGGGTCTGAA GATCCACCTG CCTTGGAGGC TATGGAAAA
 1201 GATATGGGCA CCAGTGCCCA CCCCTGAGAG TTTCTTCCAG CCCCTGTACA
 1251 GGGAGCACAG CCGGAACCTC AAGAAATGGG TTAATACCCC TTTCACGGCC
 1301 TCCAGCATAG AGTTGGTGCC ACAGAGTTCC ACAACAACAT CAGCCTTACA
 1351 TCTGTCAATG TATCCAGCCA AGGAGAAGAA GTTCCCGGGG CTGCCCGGTC
 1401 TGGAAAGAGCA ACTGGAGTGT GATGGAATGT CTGAGCCTGG TCACTGGTGC

FIG.1 (continuación)

1451 ATAATCCCCT TGGCAGCTGG CCAAGCGGTC TCAGCCTACA GTGAGGAGAG
1501 AGACCGGCCA TATGGTCTGG TGTCCATTGA CACAGTGA CT GTGGGAGATG
1551 CAGAGGGCCT GTGTGTCTGG CCCTGTAGCT GTGAGGATGA TGGCTATCCA
1601 GCCATGAACC TGGATGCTGG CCGAGAGTCT GGCCCTAATT CAGAGGATCT
1651 GCTCTTGGTC ACAGACCCTG CTTTTCTGTC TTGCGGCTGT GTCTCAGGTA
1701 GTGGTCTCAG GCTTGGAGGC TCCCCAGGCA GCCTACTGGA CAGGTTGAGG
1751 CTGTCAATTTG CAAAGGAAGG GGACTGGACA GCAGACCCAA CCTGGAGAAC
1801 TGGGTCCCCA GGAGGGGGCT CTGAGAGTGA AGCAGGTTCC CCCCTTGGTC
1851 TGGACATGGA CACATTTGAC AGTGGCTTTG CAGGTTCAGA CTGTGGCAGC
1901 CCCGTGGAGA CTGATGAAGG ACCCCCTCGA AGCTATCTCC GCCAGTGGGT
1951 GGTCAAGACC CCTCCACCTG TGGACAGTGG AGCCAGAGC AGCTAGCATA
2001 TAATAACCAG CTATAGTGAG AAGAGGCCTC TGAGCCTGGC ATTTACAGTG
2051 TGAACATGTA GGGGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG
2101 TGTGTGTGTG TGTGTGTGTG TGTCTTGGGT TGTGTGTGTG CACATCCATG
2151 TTGGGATTTG GTCTGTTGCT ATGTATTGTA ATGCTAAATT CTCTACCCAA
2201 AGTTCAGGCT CTACGAGTGA ATTCTCATGT TTACAAACTT GCTGTGTAAA
2251 CCTTGTTCCT TAATTTAATA CCATTGGTTA AATAAAATTG GCTGCAACCA
2301 ATTACTGGAG GGATTAGAGG TAGGGGGCTT TTGAGTTACC TGTTTGGAGA
2351 TGGAGAAGGA GAGAGGAGAG ACCAAGAGGA GAAGGAGGAA GGAGAGGAGA
2401 GGAGAGGAGA GGAGAGGAGA GGAGAGGAGA GGAGAGGAGA GGAGAGGAGA
2451 GGCTGCCGTG AGGGGAGAGG GACCATGAGC CTGTGGCCAG GAGAAACAGC
2501 AAGTATCTGG GGTACACTGG TGAGGAGGTG GCCAGGCCAG CAGTTAGAAG
2551 AGTAGATTAG GGGTGACCTC CAGTATTTGT CAAAGCCAAT TAAAATAACA
2601 AAAAAAAAAA AAAAGCGGCC GCTCTAGA

FIG.2A

1 MPRGPVAALL LLILHGAWSC LDLCYTDYL WTITCVLETR SPNPSILSLT
 51 WQDEYEELQD QETFCSLHRS GHNTTHIWYT CHMRLSQFLS DEVFIVNVTD
 101 QSGNNSQECG SFVLAESIKP APPLNVTVAF SGRYDISWDS AYDEPSNYVL
 151 RGKLQYELQY RNLRDYAVR PVTKLISVDS RNVSLPEEF HKDSSYQLQV
 201 RAAFQPGTSF RGT**WSEWS**DP VIFQTQAGEP EAGWDPHMLL LLAVLIIVLV
 251 FMGLKIHPW RLWKKIWAPV PTPEFFFQPL YREHSGNEFKK WVNTPF~~T~~ASS
 301 IELVPSSTT TSALHLSLYP AKEKKFFGLP GLEEQLECDG MSEFGHCII
 351 PLAAGQAVSA YSEERDRPYG LVSIDTVTVG DAEGLCVWPC SCEDDGY~~P~~AM
 401 NLDAGRESGP NSEDLLLVTD PAFLSCGCVS GSGLRLGGSP GSLLDRLRLS
 451 FAKEGDWTAD PTWRTGSPGG GSESEAGSPP GLDMDTFDSG FAGSDCGSPV
 501 ETDEGP~~P~~RSY LRQWVVRTPP PVDGAQSS

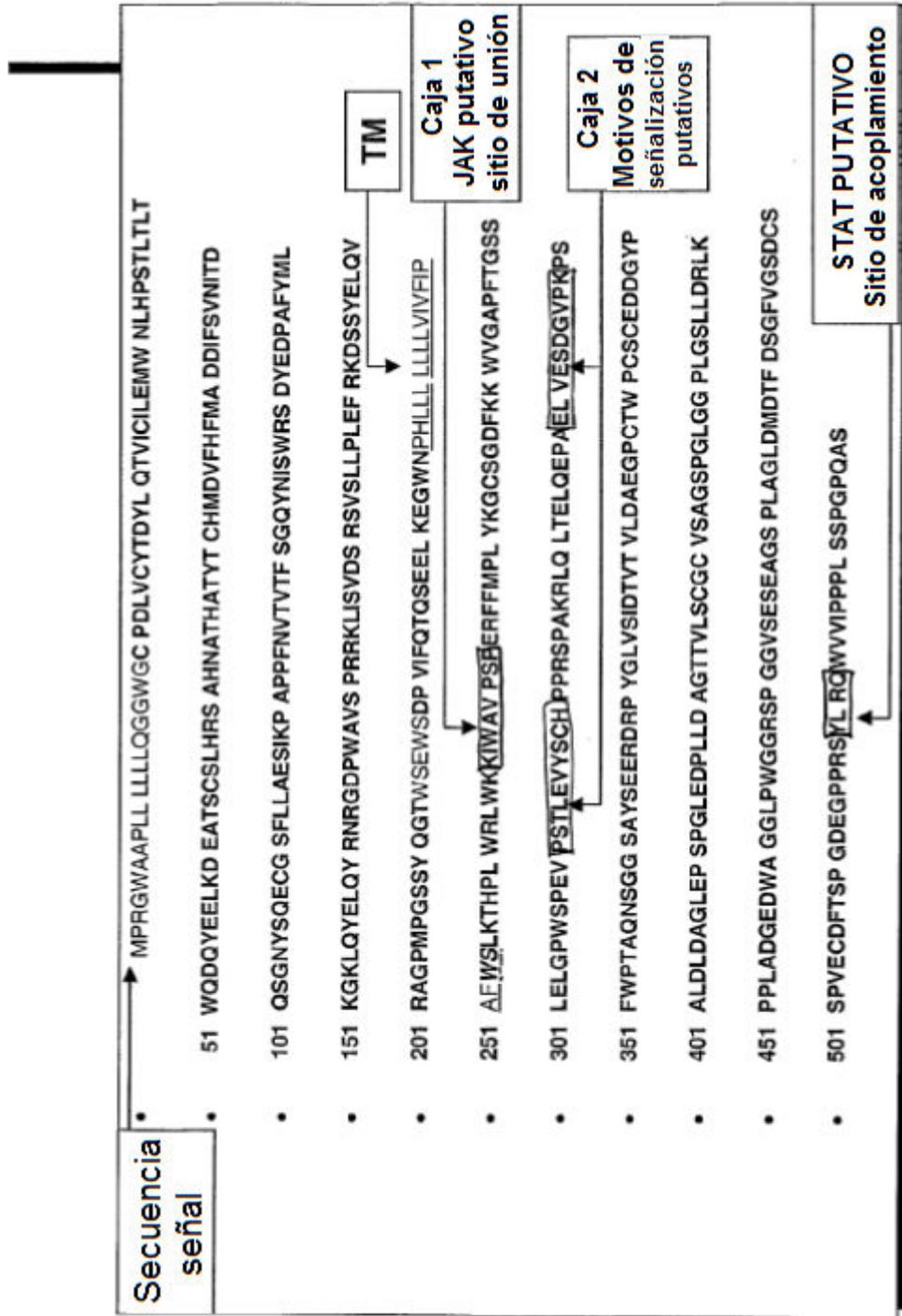


Figura 2B

FIG.3

```

huMU-1 .....NNGTCGACTGGAGGCCAGCTGCCCGTCATCA 32
      ::|| | | ||||| ||||| |
murMU-1 CAGCCCTACTGTCTTCCCTCTGTGTAGGCTCTGCCAGATGCCCGGC.... 196
huMU-1 GAGTGACAGGTCTTATGACAGCCTGATTGGTGACTCGGGCTGGGTGTGGA 82
      || | || | || | || | ||||| || | ||||
murMU-1 TGGTCCTCAGCCTCAGGACTATCTCAGCAGTGACTC.CCCTGATTCTGGA 245
huMU-1 TTCTCACCCAGGCCCTCTGCCTGCTTTCTCAGACCCATCATCT...GTCAC 129
      | |||| | | | | | |||| ||| ||| || |
murMU-1 CTTGCACCTGACTGAACTCCTGCCACCTCAAACCTTCACCTCCCACCAC 295
huMU-1 CCCCACGCTGAACCCAGCTG.....CCACCCCAAGAAGCCCATCAGACT 173
      | |||| | || |||| | |||| |||| | ||| | | |
murMU-1 CACCCTCCGAGTCCCCTGTGACTCCCACGCCAGGAGACCACCCAGT 345
huMU-1 GCCCCAGCACACGGAATGGATTCTGAGAAAGAAGCCGAAACAGAAGGC 223
      | ||||| | | ||||| ||||| ||||| | ||| || |||
murMU-1 G.CCCCAGCCTAAAGAAATGGCTTCTGAGAAAGACCCTGAAGGAGTAGGT 394
huMU-1 CCGTGGGAGTCAGCATGCCGCGTGGCTGGGCCGCGCCCTTGTCTCTGCTG 273
      | |||| | ||||| || ||| | || ||| ||||| |||||
murMU-1 C..TGGGACACAGCATGCCCGGGGCCAGTGGCTGCCTTACTCCTGCTG 442
huMU-1 CTGCTCCAGGGAGGCTGGGGCTGCCCGACCTCGTCTGCTACACCGATTA 323
      | |||| |||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||
murMU-1 ATTCPCATGGAGCTTGGAGCTGCCTGGACCTCACCTGCTACACTGACTA 492
huMU-1 CCTCCAGACGGTCATCTGCATCCTGGAAATGTGGAACCTCCACCCAGCA 373
      |||| ||| ||| ||| ||||| | ||| || | ||||| |||||
murMU-1 CCTCTGGACCATCACCTGTCTCCTGGSAGACACGGAGCCCCAACCCAGCA 542
huMU-1 CGCTCACCCCTTACCTGGCAAGACCAGTATGAAGAGCTGAAGGACGAGGCC 423
      |||| || ||||| ||||| | |||| || || ||||| |||
murMU-1 TACTCAGTCTCACCTGGCAAGATGAATATGAGGAACCTCAGGACCAAGAG 592
huMU-1 ACCTCCTGCAGCCTCCACAGGTCCGGCCACAATGCCACGCATGCCACCTA 473
      |||| ||||| ||||| ||||| | ||||| |||| ||| ||
murMU-1 ACCTTCTGCAGCCTACACAGGTCTGGCCACAACACCACACATATATGGTA 642
huMU-1 CACCTGCCACATGGATGTATCCACTTCATGGCCGACGACATTTTCAGTG 523
      ||| ||||| ||| | | || ||| || |||| || ||||| ||
murMU-1 CACGTGCCATATGGGCTTGTCTCAATTCCTGTCCGATGAAGTTTCATTG 692
huMU-1 TCAACATCACAGACAGTCTGGCAACTACTCCAGGAGTGTGGCAGCTTT 573
      |||| | || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
murMU-1 TCAATGTGACGGACCAAGTCTGGCAACRACTCCCAAGAGTGTGGCAGCTTT 742
huMU-1 CTCTGGCTGAGAGCATCAGCCGGCTCCCCCTTTCAACGTGACTGTGAC 623
      ||||| ||||| ||||| || ||||| || ||||| || ||||| |||||
murMU-1 GTCTGGCTGAGAGCATCAAACAGCTCCCCCTTGAACGTGACTGTGGC 792
huMU-1 CTTCTCAGGACAGTATAATATCTCCTGGCGCTCAGATTACGAAGACCCTG 673
      ||||| |||| ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
murMU-1 CTTCTCAGGACGCTATGATATCTCCTGGGACTCAGCTTATGACGAACCT 842
huMU-1 CCTTCTACATGCTGAAGGGCAAGCTTCAGTATGAGCTGCAGTACAGGAAC 723
      || |||| ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| |||||
murMU-1 CCAACTACGTGCTGAGGGCAAGCTACAATATGAGCTGCAGTATCGGAAC 892
huMU-1 CGGGGAGACCCCTGGGCTGTGAGTCCGAGGAGAAAGCTGATCTCAGTGGAA 773
      | ||||| ||||| ||| || ||||| ||||| |||||
murMU-1 CTCAGAGACCCCTATGCTGTGAGGCCGGTGACCAAGCTGATCTCAGTGGAA 942
huMU-1 CTCAGAAGTGTCTCCCTCCTCCCCCTGGAGTCCGCAAGACTCGAGCT 823
    
```

FIG.3 (continuación)

```

murMU-1  ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| || |||||
          CTCAAGAAACGTCTCTCTTCTCCCTGAGAGTCCACAAAGATTCTAGCT 992
huMU-1   ATGAGCTGCAGGTGCGGGCAGGGCCCATGCCTGGCTCCTCTACCAGGGG 873
          | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
murMU-1   ACCAGCTGCAGGTGCGGGCAGGGCCCTCAGCCAGGCACCTTCATTCAGGGGG 1042
huMU-1   ACCTGGAGTGAATGGAGTGACCCGGTCATCTTTCAGACCCAGTCAGAGGA 923
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
murMU-1   ACCTGGAGTGAATGGAGTGACCCGGTCATCTTTCAGACCCAGGCAGGGGA 1092
huMU-1   GTTAAGGAGGGCTGGAACCCCTCACCTGCTGCTTCTCCTCCTGCTTGCTCA 973
          | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
murMU-1   GCCCGAGGCAGGCTGGGACCCCTCACATGCTG...CTGCTCCTGGCTGTCT 1139
huMU-1   TAGTCTTCATTCCTGCCTTCTGGAGCCTGAAGACCCATCCATTTGGAGG 1023
          | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
murMU-1   TGATCATTGTCTGCTGTTTTCATGGGTCTGAAGATCCACCTGCCTTGGAGG 1189
huMU-1   CTATGGAAGAAGATATGGG...CGTCCCAGCCCTGAGCGGTTCTTCAT 1070
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
murMU-1   CTATGGAAGAAGATATGGGACCCAGTGCACCACCCCTGAGAGTTTCTTCCA 1239
huMU-1   GCCCCTGTACAAGGGCTGCAGCGGAGACTTCAAGAAATGGGTGGGTGCAC 1120
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
murMU-1   GCCCCTGTACAGGAGCACAGCGGGAJCTTCAAGAAATGGGTTAATACCC 1289
huMU-1   CCTTCACTGGCTCCAGCCTGGAGCTGGGACCCCTGGAGCCAGAGGTGCCC 1170
          | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
murMU-1   CTTTACGGCTCCAGCATAGAGTTGGTGCCACAGAGTTCACACAACA 1339
huMU-1   TCCACCTGGAGGTGTACAGCTGCCACCCACCACGGAGCCCGGCAAGAG 1220
          || |||| || |||| || |||| || |||| || |||| || ||||
murMU-1   TCAGCCTTACATCTGT.....CATTGTATCCAGCCAAGGA 1374
huMU-1   GCTGCAGCTCAGGAGCTACAAGAACCAGCAGAGCTGGTGGAGTCTGACG 1270
          | |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| ||||
murMU-1   GAAGAAGTCCCGGGCTGCCGGCTCTGGAAGAGCAACTGGAGTGTGATG 1424
huMU-1   GTGTGCCCAAGCCAGCTTCTGG.....CGACAGCCAGAACTCG 1311
          | |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| ||||
murMU-1   GAATGTCTGAGCCTGGTCACTGGTGCA7AATCCCCTTGGCAGCTGGCCAA 1474
huMU-1   GGGGGCTCAGCTTACAGTGAGGAGAGGGATCGGCCATACGGCCTGGTGTC 1361
          | |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| |||| ||||
murMU-1   GCGGTCTCAGCCTACAGTGAGGAGAGAGAACCGGCCATATGGTCTGGTGTC 1524
huMU-1   CATTGACACAGTGAAGTGTGCTAGATGCAGAGGGGCCATGCACCTGGCCCT 1411
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
murMU-1   CATTGACACAGTGAAGTGTGCTAGATGCAGAGGGGCCATGCACCTGGCCCT 1574
huMU-1   GCAGCTGTGAGGATGACGGCTAOCAGCCCTGGACCTGGATGCTGGCCCTG 1461
          | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
murMU-1   GTAGCTGTGAGGATGATGGCTATCCAGCCATGAACCTGGATGCTGGCCGA 1624
huMU-1   GAGCCAGCCAGGCCFAGAGGACCCACTCTTGGATGCAGGACCCACAGT 1511
          ||| | |||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
murMU-1   GAGTCTGGCCCTAATTCAGAGGATCTGCTCTGGTCAACAGCCCTGCTTT 1674
huMU-1   CCTGTCTGTGGCTGTGTCTCAGCTGGCAGCCCTGGGCTAGGAGGGCCCC 1561
          ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
murMU-1   TCTGTCTTGCGGCTGTGTCTCAGGTAGTGGTCTCAGGCTTGGAGGCTCCC 1724
huMU-1   TGGGAAGCCTCCTGGACAGACTAAGCCACCCCTTGCAGATGGGAGGAC 1611
          || |||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
murMU-1   CAGGCAGCCTACTGGACAGGTTGAGGCTGTCAATTGCAAGGAAGGGGAC 1774
huMU-1   TGGGCTGGGGACTGCCCTGGGGTGGCCGGTCACTGGAGGGGTCTCAGA 1661
    
```

FIG. 3 (continuación)

```

murMU-1  ||| | | | | |||| | |||| | ||||| ||| ||
TGGACAGCAGACCCAACTGGAGAAGTGGGTCCCCAGGAGGGGGCTCTGA 1824

huMU-1  .GAGTGAGGCGGGCTCACCCCTGGCCGGCCTGGATATGGACACGTTTGACA 1711
||||| || || || |||| | || ||||| ||||| |||||

murMU-1  GAGTGAAGCAGGTTCCCCC...CTGGTCTGGACATGGACACATTTGACA 1871

huMU-1  GTGGCTTTGFGGGCTCTGACTGCAGCAGCCCTGTGGAGTGTGACTTCACC 1761
||||||| || || ||||| ||||| ||||| |

murMU-1  GTGGCTTTGCAGGTTCAGACTGTGCCAGCCCCGTGGAGACT..... 1912

huMU-1  AGCCCCGGGGACGAAGGACCCCCCGGAGCTACCTCCGCCAGTGGGTGGT 1811
|| ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| |||||

murMU-1  .....GATGAAGGACCCCTCGAAGCTATCTCCGCCAGTGGGTGGT 1953

huMU-1  CATTCTCCGCCACTTTCGAGCCCTGGACCCAGGCCAGCTAATGAGGCT 1861
|| | || |||| | | |||| ||||| |||||

murMU-1  CAGGACCCCTCCACCTGPGGACAGTGGAGCCAGAGCAGCTA..... 1995

huMU-1  GACTGGATGTCAGAGCTGGCCAGGCCACTGGGCCCTGAGCCAGAGACAA 1911
| | | |||| | | || |||||

murMU-1  .GCATATAATAACCAGCTATAGTGAGAAGAGGCCCTCTGAGCC..... 2036

huMU-1  TGGGCCTTTGAGCCTGATGTTTACAGTGTCTGTGTGTGTGTGCATATG 2011
||| || || ||| | || ||||| ||||| |||

murMU-1  TGGCATTACAGTGTGAACATGTAGGGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG 2086

huMU-1  TGTGTGTGTGCATATGCATGTGTGTGTGTGTGTGTCTTACTGGACTCA 2061
||||||| || || ||||| ||||| ||||| | |

murMU-1  TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTT.GGGTGTGT 2135

huMU-1  CGGAGCTCACCCATGTGCACAAGTGTGCACAGTAAACGTGTTTGGGTCA 2111
||| || ||||| | || || |||||

murMU-1  GTTAGCACATCCATGTTGGGATTTG.....GTCTGTGCTA 2171

huMU-1  ACAGATGACAACAGCCGTCCTCCCTCCTAGGGTCTTGTGTGCAAGTTGG 2161
|| | || || || ||||| ||||| |||||

murMU-1  TGTATTGTAATGCTAAATTCCTACCCAAAGTCTAGGCCCTACGAGTGAA 2221

huMU-1  TCCACAGCATCTCCGGGGCTTTGTGGGATCAGGGCATTGCCTGTGACTGA 2211
| || | | | |||| | | | |||| | |

murMU-1  TTCTCATGTTTACAAACTGCTGTGTAAACCTTG...TTCCTTAATTTAA 2268

huMU-1  GGCGGAGCCCAGCCCTCCAGCGTCTGCCTCCAGGAGCTGCAAGAAGTCCA 2261
| | | |||| ||| ||| | | | |

murMU-1  TACCATTGGTTAAATAAAATTGGCTGCAACCAATTACTGGAGGGATTAGA 2318

huMU-1  TATTG.....TTCCTTATCACCTGCCAACAGGAAGCGAAAGGGGATGGAG 2306
| | || || |||| | || || |||| | ||||

murMU-1  GGTAGGGGGCTTTTGAGTTACCTGTTTGGAGATGGAGAAGGAGAGAGGAG 2368

huMU-1  TGAGCCCATGGTGACCTCGGGAATGGCAATTTTGGGGCGCCCTGGAC 2356
|| | || || || || | || || || || ||

murMU-1  AGACCAAGAGGAGAAGGAGGAAGGAGAGGAGAGGAGAGGAGAGGAGGGA 2418

huMU-1  GAAGGTCTGAATCCCGACTCTGATACCTTCTGGCTGTGCTACCTGAGCCA 2406
|| | || || || || || || || || || ||

murMU-1  GAGGAGAGGAGAGGAGA.GGAGAGGAGAGGAGAGGCTGCCGTGAGGGGAG 2467

huMU-1  AGTCGCCCTCCCTCTCTGGGCTAGAGTTTCTTATCCAGACAGTGGGGAA 2456
|| || || |||| | |||| | | |

murMU-1  AGGGACCATGAGCCTGTGGCCAGGAGAAACAGCA.....AGTA 2505

huMU-1  GGCATGACACACCTGGGGGAAATGGCGATGTCACCCGTGTACGGTACGC 2506
| |||| | | | |||| | | | |||| | | |

murMU-1  TCTGGGGTACACTGTTGAGGAGGTGGCCAGGCCAGC..AGTTAGAAGAGT 2553

huMU-1  AGCCCAGAGCAGACCCCTCAATAAACGTGAGCTTCCTTCAAAAAAAAAA 2556

```

FIG.3 (continuación)

```

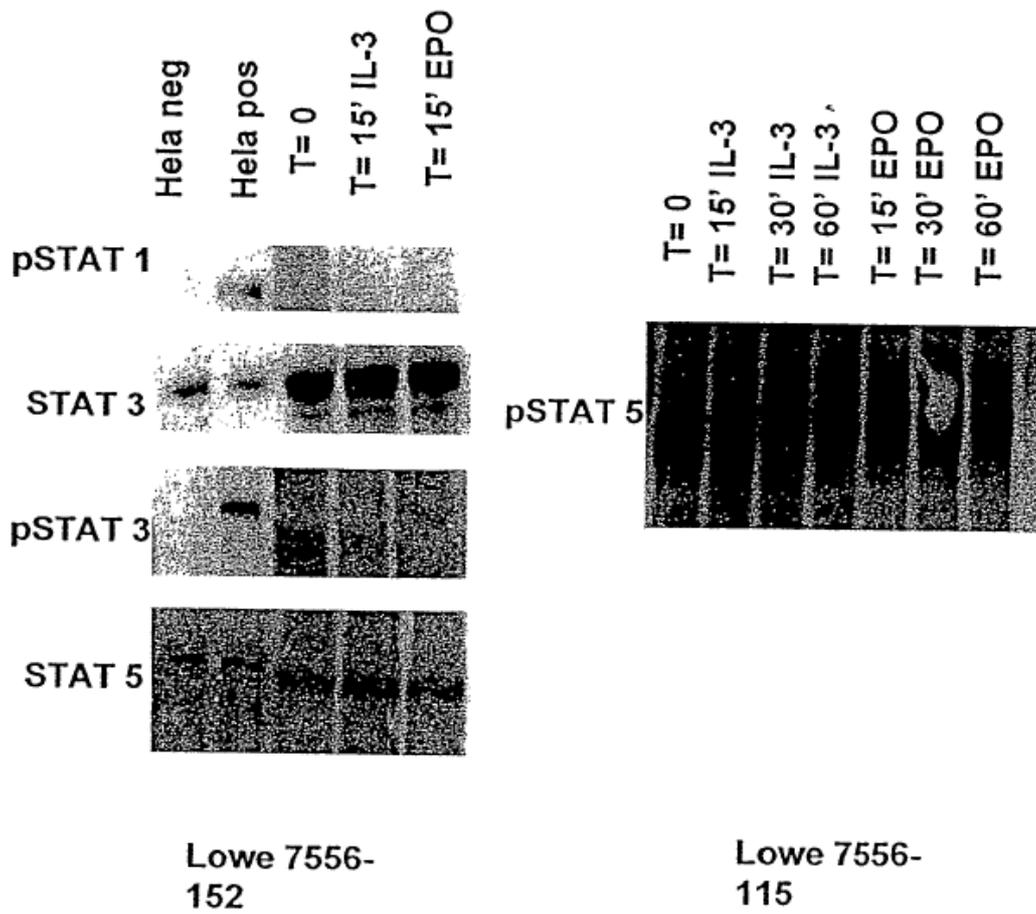
      ||  || |  |||  || ||  |||  | | |||  || |||
murMU-1 AGATTAGGGGTGACCTCCAGTATITGTCAAAGCCATTAAAATAACAAA 2603
      .
huMU-1  AAAAACTAGA..... 2567
      |||  ||
murMU-1  AAAAAAAAAAGCGGCCCTCTAGA 2628
```


FIG.5

	1				50
humu	~~~MPRGWAA	<u>PLLLLL..LQ</u>	<u>GGWG.....</u>	CPDLVCYTDY	LQTVICILEM
mousemu	~~~MPRGPVA	<u>ALLLLI..LH</u>	<u>GAWG.....</u>	CLDLTCYTDY	LWTITCVLET
humil2rbc	<u>MAAPALSWRL</u>	<u>PLLILLLPLA</u>	<u>TSWASAAVNG</u>	TSQFTCFYNS	RANISCVWSQ
	51				100
humu	WN..LHPSTL	TLTWQDQYEE	LKDEATSCSL	HRSAHNATHA	TYTCHM....
mousemu	RS..PNPSIL	SLTWQDEYEE	LQDQETFCSL	HRSGHNTTHI	WYTCHM....
humil2rbc	DGALQDTSCQ	VHAWPDR...	.RRWNQTCELLPVSQA	SWACNLILGA
	101				150
humu	.DVFHFMADD	IFSVNITDQS	GN..YSQECG	SFLLAESIKP	APPFNVTVTF
mousemu	.RLSQFLSDE	VFIVNVTDQS	GN..NSQECG	SFVLAESIKP	APPLNVTVAF
humil2rbc	PDSQKLTTVD	IVTLRVLCRE	GVRWRVMAIQ	DFKPFENLRL	MAPISLQVVH
	151				200
humu	..SGQYNISW	RSDYEDPAFY	MLK GKLYEEL	QYRNRGDPWA	VSPRRKLISV
mousemu	..SGRYDISW	DSAYDEPSNY	VLRGKLYEEL	QYRNLRDPYA	VRPVTKLISV
humil2rbc	VETHRCNISW	E..ISQASHY	FER.HLEFEA	RTLSPGHTWE	EAP...LLTL
	201				250
humu	DSRSVSLPL	EFRKDSSYEL	QVRAGPMPGS	SYQGTWSEWS	DPVIFQTS.
mousemu	DSRNVSLPE	EFHKDSSYQL	QVRAAPQPGT	SFRGTWSEWS	DPVIFQTA.
humil2rbc	KQKQEWICLE	TLTPDTQYEF	QVRVKPLQGE	F..TTWSPWS	QPLAFRTKPA
	251				300
humu	..EELKEGWN	<u>PHLLLLL...</u>	<u>LLVIVFIPAF</u>	<u>WSLKTHPLWR</u>	<u>LWKKIWA.VP</u>
mousemu	..GEPEAGWD	<u>PHMLLLL...</u>	<u>AVLIIVL.VF</u>	<u>MGLKIHLPLWR</u>	<u>LWKKIWAQVP</u>
humil2rbc	ALGKDTIPWL	<u>GHLVLGLSGA</u>	<u>FGFIILVYLL</u>	<u>INCRNTGPW.</u>	<u>LKKVLKCNTP</u>
	301				350
humu	<u>SPERFFMPLY</u>	<u>KGCSGDFKKW</u>	<u>VGAPFTGSSL</u>	<u>ELGPWSPEVP</u>	<u>STLEVYSCHP</u>
mousemu	<u>TEPFFQPLY</u>	<u>REHSGNFKKW</u>	<u>VNTPFTASSI</u>	<u>ELVPQSSTT</u>	<u>SAL....HL</u>
humil2rbc	DPSKFFSOLS	SEHGGDVQKW	LSSPFPSSSF	SPGGLAPEIS	PLEVLERDKV
	351				400
humu	<u>PRSPAKRLQL</u>	<u>TELQEPA..E</u>	<u>LVESDGVPKP</u>	<u>SFW...PTAQ</u>	<u>NSGGSAYSEE</u>
mousemu	<u>SLYPAKEKKF</u>	<u>PGLPGL..E</u>	<u>QLECDGMSEP</u>	<u>GHWCIIPLAA</u>	<u>GQAVSAYSEE</u>
humil2rbc	TQLLLQQDKV	PEPASLSSNH	SLTSCFTNQG	YFFFHLPDAL	EIEACQVYFT
	401				450
humu	RDRPYGLVSI	DTVTVLDAEG	PC...TWPCS	CEDDGYPALD	LDAGLEPSPG
mousemu	RDRPYGLVSI	DTVTVGDAEG	LC...VWPCS	CEDDGYPAMN	LDAGRESGPN
humil2rbc	YD.PYSEEDP	DEGVAGAPTG	SSPQPLQPLS	GEDDAYCTF.PS
	451				500
humu	LEDPLLDAGT	TVLSCGCVSA	GSPGLGGPLG	SLLDRLKPPL	AD..GEDWAG
mousemu	SEDLLLVTD	AFLSCGCVSG	SGLRLGGSPG	SLLDRLRLSF	AK..EGDWTA
humil2rbc	RDDLLIFS.P	SLL..GGPSP	PSTAPGGS.G	AGEERMPPSL	QERVPRDWD
	501				550
humu	GLPWGGRSPG	GVSESEAGSP	LAGLDMDFD	SGFVGSDCSS	PVECDFTSPG
mousemu	DPTWRTGSPG	GGSESEAGSP	.PGLDMDFD	SGFAGSDCGS	PVET.....
humil2rbc	Q.PLGPPTPG	VPDLVDFQPP	P...ELVLRE	AGEEVPDAG.	PRE.GVSPFP
	551			588	
humu	DEGPPRSYLR	QWVVIPLPLS	SPGPQAS+~	~~~~~	
mousemu	DEGPPRSYLR	QWVVRTPPP	DSGAQSS---	~~~~~	
humil2rbc	SRPPQGQEFR	ALNARLPLNT	DAYLSLQELQ	GQDPHTLV	

FIG.6

Señalización a través de MU-1



atg Met 1	aaa Lys	ttc Phe	tta Leu	gtc Val 5	aac Asn	gtt Val	gcc Ala	ctt Leu	gtt Val 10	ttt Phe	atg Met	gtc Val	gtg Val	tac Tyr 15	att Ile	48
tct Ser	tac Tyr	atc Ile	tat Tyr 20	gcc Ala	ggc Gly	agc Ser	gga Gly	cac His 25	cac His	cat His	cat His	cac His	cac His 30	ggt Gly	agc Ser	96
ggc Gly	gac Asp	tat Tyr 35	aaa Lys	gac Asp	gat Asp	gac Asp	gat Asp 40	aag Lys	ggt Gly	tcc Ser	gga Gly	tgc Cys 45	ccc Pro	gac Asp	ctc Leu	144
gtc Val	tgc Cys 50	tac Tyr	acc Thr	gat Asp	tac Tyr	ctc Leu 55	cag Gln	acg Thr	gtc Val	atc Ile	tgc Cys 60	atc Ile	ctg Leu	gaa Glu	atg Met	192
tgg Trp 65	aac Asn	ctc Leu	cac His	ccc Pro	agc Ser 70	acg Thr	ctc Leu	acc Thr	ctt Leu	acc Thr 75	tgg Trp	caa Gln	gac Asp	cag Gln	tat Tyr 80	240
gaa Glu	gag Glu	ctg Leu	aag Lys	gac Asp 85	gag Glu	gcc Ala	acc Thr	tcc Ser	tgc Cys 90	agc Ser	ctc Leu	cac His	agg Arg	tgc Ser 95	gcc Ala	288
cac His	aat Asn	gcc Ala	acg Thr 100	cat His	gcc Ala	acc Thr	tac Tyr	acc Thr 105	tgc Cys	cac His	atg Met	gat Asp	gta Val 110	ttc Phe	cac His	336
ttc Phe	atg Met	gcc Ala 115	gac Asp	gac Asp	att Ile	ttc Phe	agt Ser 120	gtc Val	aac Asn	atc Ile	aca Thr	gac Asp 125	cag Gln	tct Ser	ggc Gly	384
aac Asn	tac Tyr 130	tcc Ser	cag Gln	gag Glu	tgt Cys	ggc Gly 135	agc Ser	ttt Phe	ctc Leu	ctg Leu	gct Ala 140	gag Glu	agc Ser	atc Ile	aag Lys	432
ccg Pro 145	gct Ala	ccc Pro	cct Pro	ttc Phe	aac Asn 150	gtg Val	act Thr	gtg Val	acc Thr	ttc Phe 155	tca Ser	gga Gly	cag Gln	tat Tyr	aat Asn 160	480
atc Ile	tcc Ser	tgg Trp	cgc Arg	tca Ser 165	gat Asp	tac Tyr	gaa Glu	gac Asp	cct Pro 170	gcc Ala	ttc Phe	tac Tyr	atg Met	ctg Leu 175	aag Lys	528
ggc Gly	aag Lys	ctt Leu	cag Gln 180	tat Tyr	gag Glu	ctg Leu	cag Gln	tac Tyr 185	agg Arg	aac Asn	cgg Arg	gga Gly	gac Asp 190	ccc Pro	tgg Trp	576
gct Ala	gtg Val	agt Ser 195	ccg Pro	agg Arg	aga Arg	aag Lys	ctg Leu 200	atc Ile	tca Ser	gtg Val	gac Asp	tca Ser 205	aga Arg	agt Ser	gtc Val	624
tcc Ser	ctc Leu 210	ctc Leu	ccc Pro	ctg Leu	gag Glu	ttc Phe 215	cgc Arg	aaa Lys	gac Asp	tgc Ser	agc Ser 220	tat Tyr	gag Glu	ctg Leu	cag Gln	672

Figura 7A

ES 2 629 395 T3

gtg	cgg	gca	ggg	ccc	atg	cct	ggc	tcc	tcc	tac	cag	ggg	acc	tgg	agt	720
Val	Arg	Ala	Gly	Pro	Met	Pro	Gly	Ser	Ser	Tyr	Gln	Gly	Thr	Trp	Ser	
225					230					235					240	
gaa	tgg	agt	gac	ccg	gtc	atc	ttt	cag	acc	cag	tca	gag	gag	tta	aag	768
Glu	Trp	Ser	Asp	Pro	Val	Ile	Phe	Gln	Thr	Gln	Ser	Glu	Glu	Leu	Lys	
				245					250					255		
gaa	ggc	tgg	aac	taa	tga	SEQ ID NO: 22										786
Glu	Gly	Trp	Asn	Pro	Val	SEQ ID NO: 23										
	260															

Figura 7B

gcggccgcac	cacc	atg	ccg	cgt	ggc	tgg	gcc	gcc	ccc	ttg	ctc	ctg	ctg	50		
		Met	Pro	Arg	Gly	Trp	Ala	Ala	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu			
		1				5					10					
ctg	ctc	cag	gga	ggc	tgg	ggc	tgc	ccc	gac	ctc	gtc	tgc	tac	acc	gat	98
Leu	Leu	Gln	Gly	Gly	Trp	Gly	Cys	Pro	Asp	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Asp	
		15				20						25				
tac	ctc	cag	acg	gtc	atc	tgc	atc	ctg	gaa	atg	tgg	aac	ctc	cac	ccc	146
Tyr	Leu	Gln	Thr	Val	Ile	Cys	Ile	Leu	Glu	Met	Trp	Asn	Leu	His	Pro	
		30				35					40					
agc	acg	ctc	acc	ctt	acc	tgg	caa	gac	cag	tat	gaa	gag	ctg	aag	gac	194
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Trp	Gln	Asp	Gln	Tyr	Glu	Glu	Leu	Lys	Asp	
		45				50				55					60	
gag	gcc	acc	tcc	tgc	agc	ctc	cac	agg	tcg	gcc	cac	aat	gcc	acg	cat	242
Glu	Ala	Thr	Ser	Cys	Ser	Leu	His	Arg	Ser	Ala	His	Asn	Ala	Thr	His	
				65					70					75		
gcc	acc	tac	acc	tgc	cac	atg	gat	gta	ttc	cac	ttc	atg	gcc	gac	gac	290
Ala	Thr	Tyr	Thr	Cys	His	Met	Asp	Val	Phe	His	Phe	Met	Ala	Asp	Asp	
			80					85					90			
att	ttc	agt	gtc	aac	atc	aca	gac	cag	tct	ggc	aac	tac	tcc	cag	gag	338
Ile	Phe	Ser	Val	Asn	Ile	Thr	Asp	Gln	Ser	Gly	Asn	Tyr	Ser	Gln	Glu	
		95					100					105				
tgt	ggc	agc	ttt	ctc	ctg	gct	gag	agc	atc	aag	ccg	gct	ccc	cct	ttc	386
Cys	Gly	Ser	Phe	Leu	Leu	Ala	Glu	Ser	Ile	Lys	Pro	Ala	Pro	Pro	Phe	
	110					115					120					
aac	gtg	act	gtg	acc	ttc	tca	gga	cag	tat	aat	atc	tcc	tgg	cgc	tca	434
Asn	Val	Thr	Val	Thr	Phe	Ser	Gly	Gln	Tyr	Asn	Ile	Ser	Trp	Arg	Ser	
					130					135					140	
gat	tac	gaa	gac	cct	gcc	ttc	tac	atg	ctg	aag	ggc	aag	ctt	cag	tat	482
Asp	Tyr	Glu	Asp	Pro	Ala	Phe	Tyr	Met	Leu	Lys	Gly	Lys	Leu	Gln	Tyr	
				145					150					155		
gag	ctg	cag	tac	agg	aac	cgg	gga	gac	ccc	tgg	gct	gtg	agt	ccg	agg	530
Glu	Leu	Gln	Tyr	Arg	Asn	Arg	Gly	Asp	Pro	Trp	Ala	Val	Ser	Pro	Arg	
			160					165					170			
aga	aag	ctg	atc	tca	gtg	gac	tca	aga	agt	gtc	tcc	ctc	ctc	ccc	ctg	578
Arg	Lys	Leu	Ile	Ser	Val	Asp	Ser	Arg	Ser	Val	Ser	Leu	Leu	Pro	Leu	
		175					180					185				
gag	ttc	cgc	aaa	gac	tcg	agc	tat	gag	ctg	cag	gtg	cgg	gca	ggg	ccc	626
Glu	Phe	Arg	Lys	Asp	Ser	Ser	Tyr	Glu	Leu	Gln	Val	Arg	Ala	Gly	Pro	
		190				195					200					
atg	cct	ggc	tcc	tcc	tac	cag	ggg	acc	tgg	agt	gaa	tgg	agt	gac	ccg	674
Met	Pro	Gly	Ser	Ser	Tyr	Gln	Gly	Thr	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Asp	Pro	
					210					215					220	

Figura 8A

ES 2 629 395 T3

gtc Val	atc Ile	ttt Phe	cag Gln	acc Thr 225	cag Gln	tca Ser	gag Glu	gag Glu	tta Leu 230	aag Lys	gaa Glu	ggc Gly	tgg Trp	aac Asn 235	ggc Gly	722
tcc Ser	ggc Gly	tct Ser	aga Arg 240	gac Asp	aaa Lys	act Thr	cac His	aca Thr 245	tgc Cys	cca Pro	ccg Pro	tgc Cys	cca Pro 250	gca Ala	cct Pro	770
gaa Glu	ctc Leu	ctg Leu 255	ggg Gly	gga Gly	ccg Pro	tca Ser	gtc Val 260	ttc Phe	ctc Leu	ttc Phe	ccc Pro 265	cca Pro	aaa Lys	ccc Pro	aag Lys	818
gac Asp	acc Thr 270	ctc Leu	atg Met	atc Ile	tcc Ser	cgg Arg 275	acc Thr	cct Pro	gag Glu	gtc Val	aca Thr 280	tgc Cys	gtg Val	gtg Val	gtg Val	866
gac Asp 285	gtg Val	agc Ser	cac His	gaa Glu	gac Asp 290	cct Pro	gag Glu	gtc Val	aag Lys	ttc Phe 295	aac Asn	tgg Trp	tac Tyr	gtg Val	gac Asp 300	914
ggc Gly	gtg Val	gag Glu	gtg Val	cat His 305	aat Asn	gcc Ala	aag Lys	aca Thr	aag Lys 310	ccg Pro	cgg Arg	gag Glu	gag Glu	cag Gln 315	tac Tyr	962
aac Asn	agc Ser	acg Thr	tac Tyr 320	cgt Arg	gtg Val	gtc Val	agc Ser	gtc Val 325	ctc Leu	acc Thr	gtc Val	ctg Leu	cac His 330	cag Gln	gac Asp	1010
tgg Trp	ctg Leu	aat Asn 335	ggc Gly	aag Lys	gag Glu	tac Tyr	aag Lys 340	tgc Cys	aag Lys	gtc Val	tcc Ser	aac Asn 345	aaa Lys	gcc Ala	ctc Leu	1058
cca Pro	gtc Val 350	ccc Pro	atc Ile	gag Glu	aaa Lys	acc Thr 355	atc Ile	tcc Ser	aaa Lys	gcc Ala	aaa Lys 360	ggg Gly	cag Gln	ccc Pro	cga Arg	1106
gaa Glu 365	cca Pro	cag Gln	gtg Val	tac Tyr	acc Thr 370	ctg Leu	ccc Pro	cca Pro	tcc Ser	cgg Arg 375	gag Glu	gag Glu	atg Met	acc Thr	aag Lys 380	1154
aac Asn	cag Gln	gtc Val	agc Ser	ctg Leu 385	acc Thr	tgc Cys	ctg Leu	gtc Val	aaa Lys 390	ggc Gly	ttc Phe	tat Tyr	ccc Pro	agc Ser 395	gac Asp	1202
atc Ile	gcc Ala	gtg Val	gag Glu 400	tgg Trp	gag Glu	agc Ser	aat Asn	ggg Gly 405	cag Gln	ccg Pro	gag Glu	aac Asn 410	aac Asn	tac Tyr	aag Lys	1250
acc Thr	acg Thr	cct Pro 415	ccc Pro	gtg Val	ctg Leu	gac Asp	tcc Ser 420	gac Asp	ggc Gly	tcc Ser	ttc Phe	ttc Phe 425	ctc Leu	tat Tyr	agc Ser	1298
aag Lys	ctc Leu 430	acc Thr	gtg Val	gac Asp	aag Lys	agc Ser 435	agg Arg	tgg Trp	cag Gln	cag Gln	ggg Gly 440	aac Asn	gtc Val	ttc Phe	tca Ser	1346

Figura 8B

tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	1394
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	
445					450					455					460	
ctc	tcc	ctg	tcc	ccg	ggt	aaa	tgagtgaatt	c	SEQ ID NO: 24							1426
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	SEQ ID NO: 25									
				465												

Figura 8C

ES 2 629 395 T3

Q ID NO:26	gcggccgcac	cacc	atg	ccg	cgt	ggc	tgg	gcc	gcc	ccc	ttg	ctc	ctg	ctg	50		
Q ID NO:27			Met	Pro	Arg	Gly	Trp	Ala	Ala	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu			
			1				5				10						
	ctg	ctc	cag	gga	ggc	tgg	ggc	tgc	ccc	gac	ctc	gtc	tgc	tac	acc	gat	98
	Leu	Leu	Gln	Gly	Gly	Trp	Gly	Cys	Pro	Asp	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Asp	
			15				20					25					
	tac	ctc	cag	acg	gtc	atc	tgc	atc	ctg	gaa	atg	tgg	aac	ctc	cac	ccc	146
	Tyr	Leu	Gln	Thr	Val	Ile	Cys	Ile	Leu	Glu	Met	Trp	Asn	Leu	His	Pro	
			30				35					40					
	agc	acg	ctc	acc	ctt	acc	tgg	caa	gac	cag	tat	gaa	gag	ctg	aag	gac	194
	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Trp	Gln	Asp	Gln	Tyr	Glu	Glu	Leu	Lys	Asp	
							50				55					60	
	gag	gcc	acc	tcc	tgc	agc	ctc	cac	agg	tcg	gcc	cac	aat	gcc	acg	cat	242
	Glu	Ala	Thr	Ser	Cys	Ser	Leu	His	Arg	Ser	Ala	His	Asn	Ala	Thr	His	
					65					70					75		
	gcc	acc	tac	acc	tgc	cac	atg	gat	gta	ttc	cac	ttc	atg	gcc	gac	gac	290
	Ala	Thr	Tyr	Thr	Cys	His	Met	Asp	Val	Phe	His	Phe	Met	Ala	Asp	Asp	
									85					90			
	att	ttc	agt	gtc	aac	atc	aca	gac	cag	tct	ggc	aac	tac	tcc	cag	gag	338
	Ile	Phe	Ser	Val	Asn	Ile	Thr	Asp	Gln	Ser	Gly	Asn	Tyr	Ser	Gln	Glu	
			95					100					105				
	tgt	ggc	agc	ttt	ctc	ctg	gct	gag	agc	atc	aag	ccg	gct	ccc	cct	ttc	386
	Cys	Gly	Ser	Phe	Leu	Leu	Ala	Glu	Ser	Ile	Lys	Pro	Ala	Pro	Pro	Phe	
							115					120					
	aac	gtg	act	gtg	acc	ttc	tca	gga	cag	tat	aat	atc	tcc	tgg	cgc	tca	434
	Asn	Val	Thr	Val	Thr	Phe	Ser	Gly	Gln	Tyr	Asn	Ile	Ser	Trp	Arg	Ser	
							130				135					140	
	gat	tac	gaa	gac	cct	gcc	ttc	tac	atg	ctg	aag	ggc	aag	ctt	cag	tat	482
	Asp	Tyr	Glu	Asp	Pro	Ala	Phe	Tyr	Met	Leu	Lys	Gly	Lys	Leu	Gln	Tyr	
											150				155		
	gag	ctg	cag	tac	agg	aac	cgg	gga	gac	ccc	tgg	gct	gtg	agt	ccg	agg	530
	Glu	Leu	Gln	Tyr	Arg	Asn	Arg	Gly	Asp	Pro	Trp	Ala	Val	Ser	Pro	Arg	
											165				170		
	aga	aag	ctg	atc	tca	gtg	gac	tca	aga	agt	gtc	tcc	ctc	ctc	ccc	ctg	578
	Arg	Lys	Leu	Ile	Ser	Val	Asp	Ser	Arg	Ser	Val	Ser	Leu	Leu	Pro	Leu	
			175					180					185				
	gag	ttc	cgc	aaa	gac	tcg	agc	tat	gag	ctg	cag	gtg	cgg	gca	ggg	ccc	626
	Glu	Phe	Arg	Lys	Asp	Ser	Ser	Tyr	Glu	Leu	Gln	Val	Arg	Ala	Gly	Pro	
							195					200					
	atg	cct	ggc	tcc	tcc	tac	cag	ggg	acc	tgg	agt	gaa	tgg	agt	gac	ccg	674
	Met	Pro	Gly	Ser	Ser	Tyr	Gln	Gly	Thr	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Asp	Pro	
							210				215					220	

Figura 9A

ES 2 629 395 T3

gtc Val	atc Ile	ttt Phe	cag Gln	acc Thr 225	cag Gln	tca Ser	gag Glu	gag Glu	tta Leu 230	aag Lys	gaa Glu	ggc Gly	tgg Trp	aac Asn 235	ggc Gly	722
tcc Ser	ggc Gly	tct Ser	aga Arg 240	gac Asp	aaa Lys	act Thr	cac His	aca Thr 245	tgc Cys	cca Pro	ccg Pro	tgc Cys	cca Pro 250	gca Ala	cct Pro	770
gaa Glu	ctc Leu	ctg Leu 255	ggg Gly	gga Gly	ccg Pro	tca Ser	gtc Val 260	ttc Phe	ctc Leu	ttc Phe	ccc Pro	cca Pro 265	aaa Lys	ccc Pro	aag Lys	818
gac Asp	acc Thr 270	ctc Leu	atg Met	atc Ile	tcc Ser	cgg Arg 275	acc Thr	cct Pro	gag Glu	gtc Val	aca Thr 280	tgc Cys	gtg Val	gtg Val	gtg Val	866
gac Asp 285	gtg Val	agc Ser	cac His	gaa Glu	gac Asp 290	cct Pro	gag Glu	gtc Val	aag Lys	ttc Phe 295	aac Asn	tgg Trp	tac Tyr	gtg Val	gac Asp 300	914
ggc Gly	gtg Val	gag Glu	gtg Val	cat His 305	aat Asn	gcc Ala	aag Lys	aca Thr 310	aag Lys 310	ccg Pro	cgg Arg	gag Glu	gag Glu	cag Gln 315	tac Tyr	962
aac Asn	agc Ser	acg Thr	tac Tyr 320	cgt Arg	gtg Val	gtc Val	agc Ser	gtc Val 325	ctc Leu	acc Thr	gtc Val	ctg Leu	cac His 330	cag Gln	gac Asp	1010
tgg Trp	ctg Leu	aat Asn 335	ggc Gly	aag Lys	gag Glu	tac Tyr	aag Lys 340	tgc Cys	aag Lys	gtc Val	tcc Ser	aac Asn 345	aaa Lys	gcc Ala	ctc Leu	1058
cca Pro	gtc Val 350	ccc Pro	atc Ile	gag Glu	aaa Lys	acc Thr 355	atc Ile	tcc Ser	aaa Lys	gcc Ala	aaa Lys 360	ggg Gly	cag Gln	ccc Pro	cga Arg	1106
gaa Glu 365	cca Pro	cag Gln	gtg Val	tac Tyr	acc Thr 370	ctg Leu	ccc Pro	cca Pro	tcc Ser	cgg Arg 375	gag Glu	gag Glu	atg Met	acc Thr	aag Lys 380	1154
aac Asn	cag Gln	gtc Val	agc Ser	ctg Leu 385	acc Thr	tgc Cys	ctg Leu	gtc Val	aaa Lys 390	ggc Gly	ttc Phe	tat Tyr	ccc Pro	agc Ser 395	gac Asp	1202
atc Ile	gcc Ala	gtg Val	gag Glu 400	tgg Trp	gag Glu	agc Ser	aat Asn	ggg Gly 405	cag Gln	ccg Pro	gag Glu	aac Asn 410	aac Asn 410	tac Tyr	aag Lys	1250
acc Thr	acg Thr	cct Pro 415	ccc Pro	gtg Val	ctg Leu	gac Asp	tcc Ser 420	gac Asp	ggc Gly	tcc Ser	ttc Phe	ttc Phe 425	ctc Leu	tat Tyr	agc Ser	1298
aag Lys	ctc Leu 430	acc Thr	gtg Val	gac Asp	aag Lys	agc Ser 435	agg Arg	tgg Trp	cag Gln	cag Gln	ggg Gly 440	aac Asn	gtc Val	ttc Phe	tca Ser	1346

Figura 9B

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc	1394
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	
445 450 455 460	
ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa tca gga atg gca tca atg aca gga ggt	1442
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser Gly Met Ala Ser Met Thr Gly Gly	
465 470 475	
caa caa atg ggt tct gga tct cat cat cat cat cat cat tct gga ggt	1490
Gln Gln Met Gly Ser Gly Ser His His His His His His Ser Gly Gly	
480 485 490	
tgagaattc	1499

Figura 9C

gcggccgcac	cacc	atg	ccg	cgt	ggc	tgg	gcc	gcc	ccc	ttg	ctc	ctg	ctg	50		
		Met	Pro	Arg	Gly	Trp	Ala	Ala	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu			
		1				5				10						
ctg	ctc	cag	gga	ggc	tgg	ggc	tgc	ccc	gac	ctc	gtc	tgc	tac	acc	gat	98
Leu	Leu	Gln	Gly	Gly	Trp	Gly	Cys	Pro	Asp	Leu	Val	Cys	Tyr	Thr	Asp	
		15				20						25				
tac	ctc	cag	acg	gtc	atc	tgc	atc	ctg	gaa	atg	tgg	aac	ctc	cac	ccc	146
Tyr	Leu	Gln	Thr	Val	Ile	Cys	Ile	Leu	Glu	Met	Trp	Asn	Leu	His	Pro	
		30				35					40					
agc	acg	ctc	acc	ctt	acc	tgg	caa	gac	cag	tat	gaa	gag	ctg	aag	gac	194
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Trp	Gln	Asp	Gln	Tyr	Glu	Glu	Leu	Lys	Asp	
		45				50				55					60	
gag	gcc	acc	tcc	tgc	agc	ctc	cac	agg	tcg	gcc	cac	aat	gcc	acg	cat	242
Glu	Ala	Thr	Ser	Cys	Ser	Leu	His	Arg	Ser	Ala	His	Asn	Ala	Thr	His	
				65					70					75		
gcc	acc	tac	acc	tgc	cac	atg	gat	gta	ttc	cac	ttc	atg	gcc	gac	gac	290
Ala	Thr	Tyr	Thr	Cys	His	Met	Asp	Val	Phe	His	Phe	Met	Ala	Asp	Asp	
			80					85					90			
att	ttc	agt	gtc	aac	atc	aca	gac	cag	tct	ggc	aac	tac	tcc	cag	gag	338
Ile	Phe	Ser	Val	Asn	Ile	Thr	Asp	Gln	Ser	Gly	Asn	Tyr	Ser	Gln	Glu	
		95					100					105				
tgt	ggc	agc	ttt	ctc	ctg	gct	gag	agc	atc	aag	ccg	gct	ccc	cct	ttc	386
Cys	Gly	Ser	Phe	Leu	Leu	Ala	Glu	Ser	Ile	Lys	Pro	Ala	Pro	Pro	Phe	
	110					115					120					
aac	gtg	act	gtg	acc	ttc	tca	gga	cag	tat	aat	atc	tcc	tgg	cgc	tca	434
Asn	Val	Thr	Val	Thr	Phe	Ser	Gly	Gln	Tyr	Asn	Ile	Ser	Trp	Arg	Ser	
					130					135					140	
gat	tac	gaa	gac	cct	gcc	ttc	tac	atg	ctg	aag	ggc	aag	ctt	cag	tat	482
Asp	Tyr	Glu	Asp	Pro	Ala	Phe	Tyr	Met	Leu	Lys	Gly	Lys	Leu	Gln	Tyr	
				145					150					155		
gag	ctg	cag	tac	agg	aac	cgg	gga	gac	ccc	tgg	gct	gtg	agt	ccg	agg	530
Glu	Leu	Gln	Tyr	Arg	Asn	Arg	Gly	Asp	Pro	Trp	Ala	Val	Ser	Pro	Arg	
			160					165					170			
aga	aag	ctg	atc	tca	gtg	gac	tca	aga	agt	gtc	tcc	ctc	ctc	ccc	ctg	578
Arg	Lys	Leu	Ile	Ser	Val	Asp	Ser	Arg	Ser	Val	Ser	Leu	Leu	Pro	Leu	
		175				180						185				
gag	ttc	cgc	aaa	gac	tcg	agc	tat	gag	ctg	cag	gtg	cgg	gca	ggg	ccc	626
Glu	Phe	Arg	Lys	Asp	Ser	Ser	Tyr	Glu	Leu	Gln	Val	Arg	Ala	Gly	Pro	
	190					195					200					
atg	cct	ggc	tcc	tcc	tac	cag	ggg	acc	tgg	agt	gaa	tgg	agt	gac	ccg	674
Met	Pro	Gly	Ser	Ser	Tyr	Gln	Gly	Thr	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Asp	Pro	
					210					215					220	

Figura 10A

gtc Val	atc Ile	ttt Phe	cag Gln	acc Thr 225	cag Gln	tca Ser	gag Glu	gag Glu	tta Leu 230	aag Lys	gaa Glu	ggc Gly	tgg Trp	aac Asn 235	ggc Gly	722
tcc Ser	ggc Gly	tct Ser	aga Arg 240	gac Asp	aaa Lys	act Thr	cac His	aca Thr 245	tgc Cys	cca Pro	ccg Pro	tgc Cys	cca Pro 250	gca Ala	cct Pro	770
gaa Glu	gcc Ala	ctg Leu 255	ggg Gly	gca Ala	ccg Pro	tca Ser	gtc Val 260	ttc Phe	ctc Leu	ttc Phe	ccc Pro	cca Pro 265	aaa Lys	ccc Pro	aag Lys	818
gac Asp	acc Thr 270	ctc Leu	atg Met	atc Ile	tcc Ser	cgg Arg 275	acc Thr	cct Pro	gag Glu	gtc Val	aca Thr 280	tgc Cys	gtg Val	gtg Val	gtg Val	866
gac Asp 285	gtg Val	agc Ser	cac His	gaa Glu	gac Asp 290	cct Pro	gag Glu	gtc Val	aag Lys	ttc Phe 295	aac Asn	tgg Trp	tac Tyr	gtg Val	gac Asp 300	914
ggc Gly	gtg Val	gag Glu	gtg Val	cat His 305	aat Asn	gcc Ala	aag Lys	aca Thr	aag Lys 310	ccg Pro	cgg Arg	gag Glu	gag Glu	cag Gln 315	tac Tyr	962
aac Asn	agc Ser	acg Thr	tac Tyr 320	cgt Arg	gtg Val	gtc Val	agc Ser	gtc Val 325	ctc Leu	acc Thr	gtc Val	ctg Leu	cac His 330	cag Gln	gac Asp	1010
tgg Trp	ctg Leu	aat Asn 335	ggc Gly	aag Lys	gag Glu	tac Tyr	aag Lys 340	tgc Cys	aag Lys	gtc Val	tcc Ser	aac Asn 345	aaa Lys	gcc Ala	ctc Leu	1058
cca Pro	gcc Ala 350	ccc Pro	atc Ile	gag Glu	aaa Lys	acc Thr 355	atc Ile	tcc Ser	aaa Lys	gcc Ala	aaa Lys 360	ggg Gly	cag Gln	ccc Pro	cga Arg	1106
gaa Glu 365	cca Pro	cag Gln	gtg Val	tac Tyr	acc Thr 370	ctg Leu	ccc Pro	cca Pro	tcc Ser	cgg Arg 375	gag Glu	gag Glu	atg Met	acc Thr	aag Lys 380	1154
aac Asn	cag Gln	gtc Val	agc Ser	ctg Leu 385	acc Thr	tgc Cys	ctg Leu	gtc Val	aaa Lys 390	ggc Gly	ttc Phe	tat Tyr	ccc Pro	agc Ser 395	gac Asp	1202
atc Ile	gcc Ala	gtg Val	gag Glu 400	tgg Trp	gag Glu	agc Ser	aat Asn	ggg Gly 405	cag Gln	ccg Pro	gag Glu	aac Asn	aac Asn 410	tac Tyr	aag Lys	1250
acc Thr	acg Thr	cct Pro 415	ccc Pro	gtg Val	ctg Leu	gac Asp	tcc Ser 420	gac Asp	ggc Gly	tcc Ser	ttc Phe	ttc Phe 425	ctc Leu	tat Tyr	agc Ser	1298
aag Lys	ctc Leu 430	acc Thr	gtg Val	gac Asp	aag Lys	agc Ser 435	agg Arg	tgg Trp	cag Gln	cag Gln	ggg Gly 440	aac Asn	gtc Val	ttc Phe	tca Ser	1346

Figura 10B

tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	1394
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	
445					450					455					460	
ctc	tcc	ctg	tcc	ccg	ggt	aaa	tgagtgaatt	c	SEQ ID NO: 28							1426
Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	SEQ ID NO: 29									
				465												

Figura 10C

ES 2 629 395 T3

atg Met 1	ccg Pro	cgt Arg	ggc Gly	tgg Trp 5	gcc Ala	gcc Ala	ccc Pro	ttg Leu	ctc Leu 10	ctg Leu	ctg Leu	ctc Leu	cag Gln 15	gga Gly	48	
ggc Gly	tgg Trp	ggc Gly	tgc Cys 20	ccc Pro	gac Asp	ctc Leu	gtc Val	tgc Cys 25	tac Tyr	acc Thr	gat Asp	tac Tyr	ctc Leu 30	cag Gln	acg Thr	96
gtc Val	atc Ile	tgc Cys 35	atc Ile	ctg Leu	gaa Glu	atg Met	tgg Trp 40	aac Asn	ctc Leu	cac His	ccc Pro	agc Ser 45	acg Thr	ctc Leu	acc Thr	144
ctt Leu	acc Trp 50	tgg Trp	caa Gln	gac Asp	cag Gln	tat Tyr 55	gaa Glu	gag Glu	ctg Leu	aag Lys	gac Asp 60	gag Glu	gcc Ala	acc Thr	tcc Ser	192
tgc Cys 65	agc Ser	ctc Leu	cac His	agg Arg	tcg Ser 70	gcc Ala	cac His	aat Asn	gcc Ala	acg Thr 75	cat His	gcc Ala	acc Thr	tac Tyr	acc Thr 80	240
tgc Cys	cac His	atg Met	gat Asp	gta Val 85	ttc Phe	cac His	ttc Phe	atg Met	gcc Ala 90	gac Asp	gac Asp	att Ile	ttc Phe	agt Ser	gtc Val	288
aac Asn	atc Ile	aca Thr	gac Asp 100	cag Gln	tct Ser	ggc Gly	aac Asn	tac Tyr 105	tcc Ser	cag Gln	gag Glu	tgt Cys	ggc Gly 110	agc Ser	ttt Phe	336
ctc Leu	ctg Leu	gct Ala 115	gag Glu	agc Ser	atc Ile	aag Lys	ccg Pro 120	gct Ala	ccc Pro	cct Pro	ttc Phe	aac Asn 125	gtg Val	act Thr	gtg Val	384
acc Thr	ttc Phe 130	tca Ser	gga Gly	cag Gln	tat Tyr	aat Asn 135	atc Ile	tcc Ser	tgg Trp	cgc Arg	tca Ser 140	gat Asp	tac Tyr	gaa Glu	gac Asp	432
cct Pro 145	gcc Ala	ttc Phe	tac Tyr	atg Met	ctg Leu 150	aag Lys	ggc Gly	aag Lys	ctt Leu	cag Gln 155	tat Tyr	gag Glu	ctg Leu	cag Gln	tac Tyr 160	480
agg Arg	aac Asn	cgg Arg	gga Gly	gac Asp 165	ccc Pro	tgg Trp	gct Ala	gtg Val	agt Ser 170	ccg Pro	agg Arg	aga Arg	aag Lys	ctg Leu 175	atc Ile	528
tca Ser	gtg Val	gac Asp	tca Ser	aga Arg	agt Ser	gtc Val	tcc Ser	ctc Leu 185	ctc Leu	ccc Pro	ctg Leu	gag Glu	ttc Phe	cgc Arg	aaa Lys	576
gac Asp	tgc Ser	agc Ser	tat Tyr	gag Glu	ctg Leu	cag Gln	gtg Val 200	cgg Arg	gca Ala	ggg Gly	ccc Pro	atg Met 205	cct Pro	ggc Gly	tcc Ser	624
tcc Ser	tac Tyr 210	cag Gln	ggg Gly	acc Thr	tgg Trp	agt Ser 215	gaa Glu	tgg Trp	agt Ser	gac Asp	ccg Pro 220	gtc Val	atc Ile	ttt Phe	cag Gln	672

Figura 11A

```

acc cag tca gag gag tta aag gaa ggc tgg aac aaa acc gaa acc tcc      720
Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Lys Thr Glu Thr Ser
225                               230                               235                               240

cag gtt gct ccg gca taa tga SEQ ID NO: 30      741
Gln Val Ala Pro Ala SEQ ID NO: 31
                               245

```

Figura 11B

ES 2 629 395 T3

atg Met 1	ccg Pro	cgt Arg	ggc Gly	tgg Trp 5	gcc Ala	gcc Ala	ccc Pro	tgg Leu 10	ctc Leu	ctg Leu	ctg Leu	ctc Leu	cag Gln 15	gga Gly	48	
ggc Gly	tgg Trp	ggc Gly	tgc Cys 20	ccc Pro	gac Asp	ctc Leu	gtc Val	tgc Cys 25	tac Tyr	acc Thr	gat Asp	tac Tyr	ctc Leu 30	cag Gln	acg Thr	96
gtc Val	atc Ile	tgc Cys 35	atc Ile	ctg Leu	gaa Glu	atg Met	tgg Trp 40	aac Asn	ctc Leu	cac His	ccc Pro	agc Ser 45	acg Thr	ctc Leu	acc Thr	144
ctt Leu	acc Thr 50	tgg Trp	caa Gln	gac Asp	cag Gln	tat Tyr 55	gaa Glu	gag Glu	ctg Leu	aag Lys	gac Asp 60	gag Glu	gcc Ala	acc Thr	tcc Ser	192
tgc Cys 65	agc Ser	ctc Leu	cac His	agg Arg	tcg Ser 70	gcc Ala	cac His	aat Asn	gcc Ala	acg Thr 75	cat His	gcc Ala	acc Thr	tac Tyr	acc Thr 80	240
tgc Cys	cac His	atg Met	gat Asp	gta Val 85	ttc Phe	cac His	ttc Phe	atg Met	gcc Ala 90	gac Asp	gac Asp	att Ile	ttc Phe	agt Ser 95	gtc Val	288
aac Asn	atc Ile	aca Thr	gac Asp 100	cag Gln	tct Ser	ggc Gly	aac Asn	tac Tyr 105	tcc Ser	cag Gln	gag Glu	tgt Cys	ggc Gly 110	agc Ser	ttt Phe	336
ctc Leu	ctg Leu	gct Ala 115	gag Glu	agc Ser	atc Ile	aag Lys	ccg Pro 120	gct Ala	ccc Pro	cct Pro	ttc Phe	aac Asn 125	gtg Val	act Thr	gtg Val	384
acc Thr	ttc Phe 130	tca Ser	gga Gly	cag Gln	tat Tyr	aat Asn 135	atc Ile	tcc Ser	tgg Trp	cgc Arg	tca Ser 140	gat Asp	tac Tyr	gaa Glu	gac Asp	432
cct Pro 145	gcc Ala	ttc Phe	tac Tyr	atg Met	ctg Leu 150	aag Lys	ggc Gly	aag Lys	ctt Leu	cag Gln 155	tat Tyr	gag Glu	ctg Leu	cag Gln	tac Tyr 160	480
agg Arg	aac Asn	cgg Arg	gga Gly	gac Asp 165	ccc Pro	tgg Trp	gct Ala	gtg Val	agt Ser 170	ccg Pro	agg Arg	aga Arg	aag Lys	ctg Leu 175	atc Ile	528
tca Ser	gtg Val	gac Asp	tca Ser 180	aga Arg	agt Ser	gtc Val	tcc Ser	ctc Leu 185	ctc Leu	ccc Pro	ctg Leu	gag Glu	ttc Phe 190	cgc Arg	aaa Lys	576
gac Asp	tcg Ser	agc Ser 195	tat Tyr	gag Glu	ctg Leu	cag Gln	gtg Val 200	cgg Arg	gca Ala	ggg Gly	ccc Pro	atg Met 205	cct Pro	ggc Gly	tcc Ser	624
tcc Ser	tac Tyr 210	cag Gln	ggg Gly	acc Thr	tgg Trp	agt Ser 215	gaa Glu	tgg Trp	agt Ser	gac Asp	ccg Pro 220	gtc Val	atc Ile	ttt Phe	cag Gln	672

Figura 12A

acc Thr 225	cag Gln	tca Ser	gag Glu	gag Glu	tta Leu 230	aag Lys	gaa Glu	ggc Gly	tgg Trp	aac Asn 235	gat Asp	gac Asp	gat Asp	gac Asp	aag Lys 240	720
ggc Gly	tcc Ser	ggc Gly	gac Asp	aaa Lys 245	act Thr	cac His	aca Thr	tgc Cys	cca Pro 250	ccg Pro	tgc Cys	cca Pro	gca Ala	cct Pro 255	gaa Glu	768
gcc Ala	ctg Leu	ggg Gly	gca Ala 260	ccg Pro	tca Ser	gtc Val	ttc Phe	ctc Leu 265	ttc Phe	ccc Pro	cca Pro	aaa Lys	ccc Pro 270	aag Lys	gac Asp	816
acc Thr	ctc Leu	atg Met 275	atc Ile	tcc Ser	cgg Arg	acc Thr	cct Pro 280	gag Glu	gtc Val	aca Thr	tgc Cys	gtg Val 285	gtg Val	gtg Val	gac Asp	864
gtg Val 290	agc Ser	cac His	gaa Glu	gac Asp	cct Pro	gag Glu 295	gtc Val	aag Lys	ttc Phe	aac Asn	tgg Trp 300	tac Tyr	gtg Val	gac Asp	ggc Gly	912
gtg Val 305	gag Glu	gtg Val	cat His	aat Asn	gcc Ala 310	aag Lys	aca Thr	aag Lys	ccg Pro	cgg Arg 315	gag Glu	gag Glu	cag Gln	tac Tyr	aac Asn 320	960
agc Ser	acg Thr	tac Tyr	cgt Arg	gtg Val 325	gtc Val	agc Ser	gtc Val	ctc Leu	acc Thr 330	gtc Val	ctg Leu	cac His	cag Gln	gac Asp 335	tgg Trp	1008
ctg Leu	aat Asn	ggc Gly	aag Lys 340	gag Glu	tac Tyr	aag Lys	tgc Cys	aag Lys 345	gtc Val	tcc Ser	aac Asn	aaa Lys	gcc Ala 350	ctc Leu	cca Pro	1056
gcc Ala	ccc Pro	atc Ile 355	gag Glu	aaa Lys	acc Thr	atc Ile	tcc Ser 360	aaa Lys	gcc Ala	aaa Lys	ggg Gly	cag Gln 365	ccc Pro	cga Arg	gaa Glu	1104
cca Pro	cag Gln 370	gtg Val	tac Tyr	acc Thr	ctg Leu	ccc Pro 375	cca Pro	tcc Ser	cgg Arg	gag Glu	gag Glu 380	atg Met	acc Thr	aag Lys	aac Asn	1152
cag Gln 385	gtc Val	agc Ser	ctg Leu	acc Thr	tgc Cys 390	ctg Leu	gtc Val	aaa Lys	ggc Gly	ttc Phe 395	tat Tyr	ccc Pro	agc Ser	gac Asp	atc Ile 400	1200
gcc Ala	gtg Val	gag Glu	tgg Trp	gag Glu 405	agc Ser	aat Asn	ggg Gly	cag Gln	ccg Pro 410	gag Glu	aac Asn	aac Asn	tac Tyr	aag Lys 415	acc Thr	1248
acg Thr	cct Pro	ccc Pro	gtg Val 420	ctg Leu	gac Asp	tcc Ser	gac Asp	ggc Gly 425	tcc Ser	ttc Phe	ttc Phe	ctc Leu	tat Tyr 430	agc Ser	aag Lys	1296
ctc Leu	acc Thr	gtg Val 435	gac Asp	aag Lys	agc Ser	agg Arg	tgg Trp 440	cag Gln	cag Gln	ggg Gly	aac Asn	gtc Val 445	ttc Phe	tca Ser	tgc Cys	1344

Figura 12B

tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	1392
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	
	450					455					460					
tcc	ctg	tcc	ccg	ggt	aaa	tga	SEQ ID NO: 32									1413
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		SEQ ID NO: 33									
465					470											

Figura 12C

Q ID NO:34	atg	ccc	cgg	ggc	cca	gtg	gct	gcc	tta	ctc	ctg	ctg	att	ctc	cat	gga	48
Q ID NO:35	Met	Pro	Arg	Gly	Pro	Val	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	His	Gly		
	1			5					10					15			
	gct	tgg	agc	tgc	ctg	gac	ctc	act	tgc	tac	act	gac	tac	ctc	tgg	acc	96
	Ala	Trp	Ser	Cys	Leu	Asp	Leu	Thr	Cys	Tyr	Thr	Asp	Tyr	Leu	Trp	Thr	
				20					25					30			
	atc	acc	tgt	gtc	ctg	gag	aca	cgg	agc	ccc	aac	ccc	agc	ata	ctc	agt	144
	Ile	Thr	Cys	Val	Leu	Glu	Thr	Arg	Ser	Pro	Asn	Pro	Ser	Ile	Leu	Ser	
			35					40					45				
	ctc	acc	tgg	caa	gat	gaa	tat	gag	gaa	ctt	cag	gac	caa	gag	acc	ttc	192
	Leu	Thr	Trp	Gln	Asp	Glu	Tyr	Glu	Glu	Leu	Gln	Asp	Gln	Glu	Thr	Phe	
			50				55					60					
	tgc	agc	cta	cac	agg	tct	ggc	cac	aac	acc	aca	cat	ata	tgg	tac	acg	240
	Cys	Ser	Leu	His	Arg	Ser	Gly	His	Asn	Thr	Thr	His	Ile	Trp	Tyr	Thr	
	65					70					75					80	
	tgc	cat	atg	cgc	ttg	tct	caa	ttc	ctg	tcc	gat	gaa	gtt	ttc	att	gtc	288
	Cys	His	Met	Arg	Leu	Ser	Gln	Phe	Leu	Ser	Asp	Glu	Val	Phe	Ile	Val	
					85					90					95		
	aat	gtg	acg	gac	cag	tct	ggc	aac	aac	tcc	caa	gag	tgt	ggc	agc	ttt	336
	Asn	Val	Thr	Asp	Gln	Ser	Gly	Asn	Asn	Ser	Gln	Glu	Cys	Gly	Ser	Phe	
				100					105					110			
	gtc	ctg	gct	gag	agc	atc	aaa	cca	gct	ccc	ccc	ttg	aac	gtg	act	gtg	384
	Val	Leu	Ala	Glu	Ser	Ile	Lys	Pro	Ala	Pro	Pro	Leu	Asn	Val	Thr	Val	
			115					120					125				
	gcc	ttc	tca	gga	cgc	tat	gat	atc	tcc	tgg	gac	tca	gct	tat	gac	gaa	432
	Ala	Phe	Ser	Gly	Arg	Tyr	Asp	Ile	Ser	Trp	Asp	Ser	Ala	Tyr	Asp	Glu	
			130				135					140					
	ccc	tcc	aac	tac	gtg	ctg	agg	ggc	aag	cta	caa	tat	gag	ctg	cag	tat	480
	Pro	Ser	Asn	Tyr	Val	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Gln	Tyr	Glu	Leu	Gln	Tyr	
	145					150					155					160	
	cgg	aac	ctc	aga	gac	ccc	tat	gct	gtg	agg	ccg	gtg	acc	aag	ctg	atc	528
	Arg	Asn	Leu	Arg	Asp	Pro	Tyr	Ala	Val	Arg	Pro	Val	Thr	Lys	Leu	Ile	
					165					170					175		
	tca	gtg	gac	tca	aga	aac	gtc	tct	ctt	ctc	cct	gaa	gag	ttc	cac	aaa	576
	Ser	Val	Asp	Ser	Arg	Asn	Val	Ser	Leu	Leu	Pro	Glu	Glu	Phe	His	Lys	
				180					185					190			
	gat	tct	agc	tac	cag	ctg	cag	gtg	cgg	gca	gcg	cct	cag	cca	ggc	act	624
	Asp	Ser	Ser	Tyr	Gln	Leu	Gln	Val	Arg	Ala	Ala	Pro	Gln	Pro	Gly	Thr	
			195					200					205				
	tca	ttc	agg	ggg	acc	tgg	agt	gag	tgg	agt	gac	ccc	gtc	atc	ttt	cag	672
	Ser	Phe	Arg	Gly	Thr	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Asp	Pro	Val	Ile	Phe	Gln	
			210				215					220					

Figura 13A

ES 2 629 395 T3

acc cag gct ggg gag ccc gag gca ggc tgg gac ggc tcc ggc tct aga	720
Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Gly Ser Gly Ser Arg	
225 230 235 240	
gagccccgcg gaccgacaat caagccctgt cctccatgca aatgcccagg taagtcacta	780
gaccagagct ccactcccgg gagaatggta agtgctataa acatccctgc actagaggat	840
aagccatgta cagatccatt tccatctctc ctcatcagca cctaacctcg agggtgacc	900
atccgtcttc atcttccctc caaagatcaa ggatgtactc atgatctccc tgagccccat	960
agtcacatgt gtgggtgggg atgtgagcga ggatgaccca gatgtccaga tcagctggtt	1020
tgtgaacaac gtggaagtac acacagctca gacacaaacc catagagagg attacaacag	1080
tactctccgg gtgggtcagtg ccctcccat ccagcaccag gactggatga gtggcaaggc	1140
tttcgcatgc gccgtcaaca acaaagacct ccagcgcgcc atcgagagaa ccatctcaaa	1200
acccaaaggt gagagctgca gcctgactgc atgggggctg ggatgggcat aaggataaag	1260
gtctgtgtgg acagccttct gcttcagcca tgacctttgt gtatgtttct accctcacag	1320
ggtcagtaag agctccacag gtatatgtct tgcctccacc agaagaagag atgactaaga	1380
aacaggtcac tctgacctgc atgggtcacag acttcatgcc tgaagacatt tacgtggagt	1440
ggaccaacaa cgggaaaaca gagctaaact acaagaacac tgaaccagtc ctggactctg	1500
atggttctta cttcatgtac agcaagctga gagtggaaaa gaagaactgg gtggaagaa	1560
atagctactc ctgttcagtg gtccacgagg gtctgcacaa tcaccacacg actaagagct	1620
tctccggac tccgggtaaa tgagctcagc acccacaata ctctcaggtc caaagagaca	1680
cccacactca tctccatgct tcccttgtat aaataaagca cccagcaatg cctgggacca	1740
tgtaatagga attc	1754

Figura 13B

ES 2 629 395 T3

ctgcaggtcg	acaccacc	atg	ccc	cgg	ggc	cca	gtg	gct	gcc	tta	ctc	ctg	51			
		Met	Pro	Arg	Gly	Pro	Val	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu				
		1				5				10						
ctg	att	ctc	cat	gga	gct	tgg	agc	tgc	ctg	gac	ctc	act	tgc	tac	act	99
Leu	Ile	Leu	His	Gly	Ala	Trp	Ser	Cys	Leu	Asp	Leu	Thr	Cys	Tyr	Thr	
			15					20					25			
gac	tac	ctc	tgg	acc	atc	acc	tgt	gtc	ctg	gag	aca	cgg	agc	ccc	aac	147
Asp	Tyr	Leu	Trp	Thr	Ile	Thr	Cys	Val	Leu	Glu	Thr	Arg	Ser	Pro	Asn	
		30					35					40				
ccc	agc	ata	ctc	agt	ctc	acc	tgg	caa	gat	gaa	tat	gag	gaa	ctt	cag	195
Pro	Ser	Ile	Leu	Ser	Leu	Thr	Trp	Gln	Asp	Glu	Tyr	Glu	Glu	Leu	Gln	
	45					50					55					
gac	caa	gag	acc	ttc	tgc	agc	cta	cac	agg	tct	ggc	cac	aac	acc	aca	243
Asp	Gln	Glu	Thr	Phe	Cys	Ser	Leu	His	Arg	Ser	Gly	His	Asn	Thr	Thr	
60					65					70					75	
cat	ata	tgg	tac	acg	tgc	cat	atg	cgc	ttg	tct	caa	ttc	ctg	tcc	gat	291
His	Ile	Trp	Tyr	Thr	Cys	His	Met	Arg	Leu	Ser	Gln	Phe	Leu	Ser	Asp	
				80					85					90		
gaa	gtt	ttc	att	gtc	aat	gtg	acg	gac	cag	tct	ggc	aac	aac	tcc	caa	339
Glu	Val	Phe	Ile	Val	Asn	Val	Thr	Asp	Gln	Ser	Gly	Asn	Asn	Ser	Gln	
			95					100					105			
gag	tgt	ggc	agc	ttt	gtc	ctg	gct	gag	agc	atc	aaa	cca	gct	ccc	ccc	387
Glu	Cys	Gly	Ser	Phe	Val	Leu	Ala	Glu	Ser	Ile	Lys	Pro	Ala	Pro	Pro	
		110				115						120				
ttg	aac	gtg	act	gtg	gcc	ttc	tca	gga	cgc	tat	gat	atc	tcc	tgg	gac	435
Leu	Asn	Val	Thr	Val	Ala	Phe	Ser	Gly	Arg	Tyr	Asp	Ile	Ser	Trp	Asp	
	125					130					135					
tca	gct	tat	gac	gaa	ccc	tcc	aac	tac	gtg	ctg	agg	ggc	aag	cta	caa	483
Ser	Ala	Tyr	Asp	Glu	Pro	Ser	Asn	Tyr	Val	Leu	Arg	Gly	Lys	Leu	Gln	
140					145					150					155	
tat	gag	ctg	cag	tat	cgg	aac	ctc	aga	gac	ccc	tat	gct	gtg	agg	ccg	531
Tyr	Glu	Leu	Gln	Tyr	Arg	Asn	Leu	Arg	Asp	Pro	Tyr	Ala	Val	Arg	Pro	
				160					165					170		
gtg	acc	aag	ctg	atc	tca	gtg	gac	tca	aga	aac	gtc	tct	ctt	ctc	cct	579
Val	Thr	Lys	Leu	Ile	Ser	Val	Asp	Ser	Arg	Asn	Val	Ser	Leu	Leu	Pro	
			175					180					185			
gaa	gag	ttc	cac	aaa	gat	tct	agc	tac	cag	ctg	cag	gtg	cgg	gca	gcg	627
Glu	Glu	Phe	His	Lys	Asp	Ser	Ser	Tyr	Gln	Leu	Gln	Val	Arg	Ala	Ala	
		190					195					200				
cct	cag	cca	ggc	act	tca	ttc	agg	ggg	acc	tgg	agt	gag	tgg	agt	gac	675
Pro	Gln	Pro	Gly	Thr	Ser	Phe	Arg	Gly	Thr	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Asp	
	205					210					215					

Figura 14A

ccc	gtc	atc	ttt	cag	acc	cag	gct	ggg	gag	ccc	gag	gca	ggc	tgg	gac	723
Pro	Val	Ile	Phe	Gln	Thr	Gln	Ala	Gly	Glu	Pro	Glu	Ala	Gly	Trp	Asp	
220					225					230					235	
ggc	agc	gga	cac	cac	cat	cat	cac	cac	ggt	agc	ggc	gac	tat	aaa	gac	771
Gly	Ser	Gly	His	His	His	His	His	His	Gly	Ser	Gly	Asp	Tyr	Lys	Asp	
			240						245					250		
gat	gac	gat	aag	tagtgagaat	tc	SEQ ID NO: 36									795	
Asp	Asp	Asp	Lys	SEQ ID NO: 37												
			255													

Figura 14B

atg Met 1	aaa Lys	ttc Phe	tta Leu	gtc Val 5	aac Asn	ggt Val	gcc Ala	ctt Leu	gtt Val 10	ttt Phe	atg Met	gtc Val	gtg Val	tac Tyr 15	att Ile	48
tct Ser	tac Tyr	atc Ile	tat Tyr 20	gcc Ala	ggc Gly	agc Ser	gga Gly	cac His 25	cac His	cat His	cat His	cac His	cac His 30	ggt Gly	agc Ser	96
ggc Gly	gac Asp	tat Tyr 35	aaa Lys	gac Asp	gat Asp	gac Asp	gat Asp 40	aag Lys	ggt Gly	tcc Ser	gga Gly	tgc Cys 45	ctg Leu	gac Asp	ctc Leu	144
act Thr	tgc Cys 50	tac Tyr	act Thr	gac Asp	tac Tyr	ctc Leu 55	tgg Trp	acc Thr	atc Ile	acc Thr	tgt Cys 60	gtc Val	ctg Leu	gag Glu	aca Thr	192
cgg Arg 65	agc Ser	ccc Pro	aac Asn	ccc Pro	agc Ser 70	ata Ile	ctc Leu	agt Ser	ctc Leu	acc Thr 75	tgg Trp	caa Gln	gat Asp	gaa Glu	tat Tyr 80	240
gag Glu	gaa Glu	ctt Leu	cag Gln	gac Asp 85	caa Gln	gag Glu	acc Thr	ttc Phe	tgc Cys 90	agc Ser	cta Leu	cac His	agg Arg	tct Ser 95	ggc Gly	288
cac His	aac Asn	acc Thr	aca Thr 100	cat His	ata Ile	tgg Trp	tac Tyr	acg Thr 105	tgc Cys	cat His	atg Met	cgc Arg	ttg Leu 110	tct Ser	caa Gln	336
ttc Phe	ctg Leu	tcc Ser 115	gat Asp	gaa Glu	ggt Val	ttc Phe	att Ile 120	gtc Val	aat Asn	gtg Val	acg Thr	gac Asp 125	cag Gln	tct Ser	ggc Gly	384
aac Asn 130	aac Asn	tcc Ser	caa Gln	gag Glu	tgt Cys	ggc Gly 135	agc Ser	ttt Phe	gtc Val	ctg Leu	gct Ala 140	gag Glu	agc Ser	atc Ile	aaa Lys	432
cca Pro 145	gct Ala	ccc Pro	ccc Pro	ttg Leu	aac Asn 150	gtg Val	act Thr	gtg Val	gcc Ala	ttc Phe 155	tca Ser	gga Gly	cgc Arg	tat Tyr	gat Asp 160	480
atc Ile	tcc Ser	tgg Trp	gac Asp	tca Ser 165	gct Ala	tat Tyr	gac Asp	gaa Glu	ccc Pro 170	tcc Ser	aac Asn	tac Tyr	gtg Val	ctg Leu 175	agg Arg	528
ggc Gly	aag Lys	cta Leu	caa Gln 180	tat Tyr	gag Glu	ctg Leu	cag Gln 185	tat Tyr	cgg Arg	aac Asn	ctc Leu	aga Arg	gac Asp 190	ccc Pro	tat Tyr	576
gct Ala	gtg Val	agg Arg 195	ccg Pro	gtg Val	acc Thr	aag Lys	ctg Leu 200	atc Ile	tca Ser	gtg Val	gac Asp	tca Ser 205	aga Arg	aac Asn	gtc Val	624
tct Ser	ctt Leu 210	ctc Leu	cct Pro	gaa Glu	gag Glu	ttc Phe 215	cac His	aaa Lys	gat Asp	tct Ser	agc Ser 220	tac Tyr	cag Gln	ctg Leu	cag Gln	672

Figura 15A

gtg	cgg	gca	gcg	cct	cag	cca	ggc	act	tca	ttc	agg	ggg	acc	tgg	agt	720
Val	Arg	Ala	Ala	Pro	Gln	Pro	Gly	Thr	Ser	Phe	Arg	Gly	Thr	Trp	Ser	
225					230					235					240	
gag	tgg	agt	gac	ccc	gtc	atc	ttt	cag	acc	cag	gct	ggg	gag	ccc	gag	768
Glu	Trp	Ser	Asp	Pro	Val	Ile	Phe	Gln	Thr	Gln	Ala	Gly	Glu	Pro	Glu	
				245					250					255		
gca	ggc	tgg	gac	tagtgagaat	tc	SEQ ID NO: 38										792
Ala	Gly	Trp	Asp			SEQ ID NO: 39										
			260													

Figura 15B

Calendario para el modelo de CIA

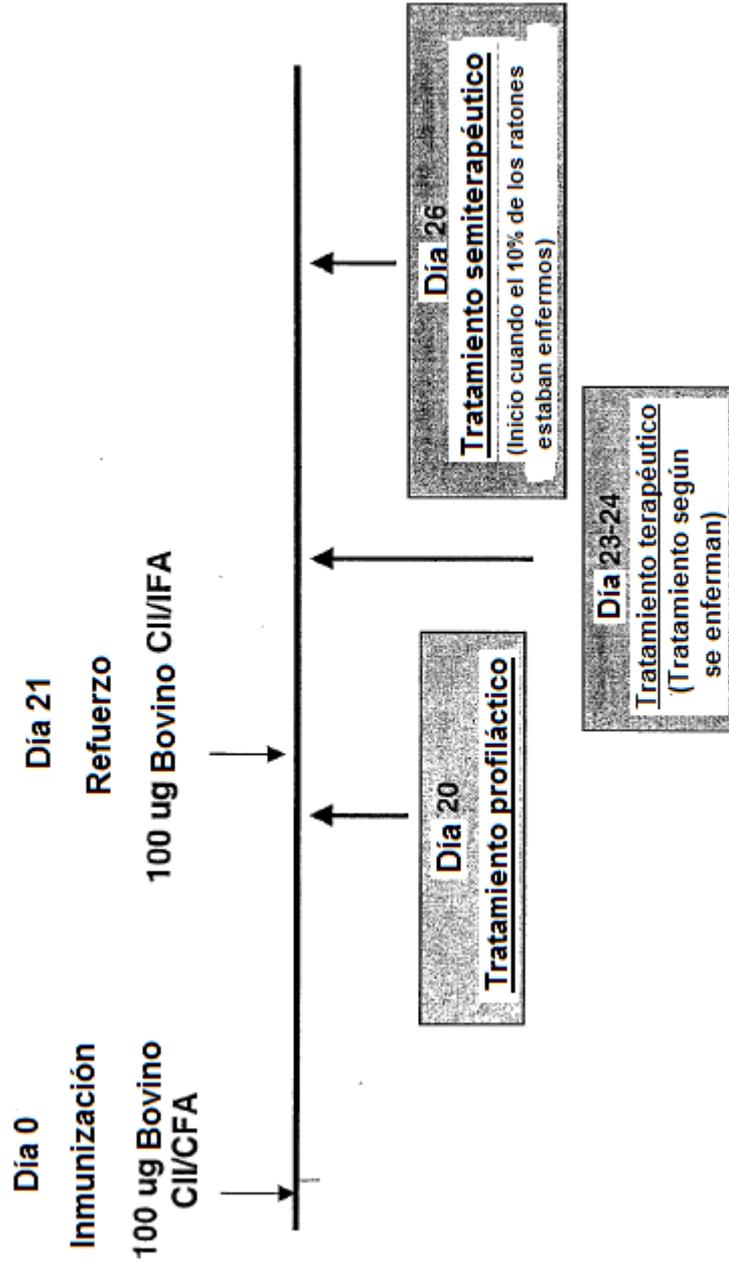


FIG.16

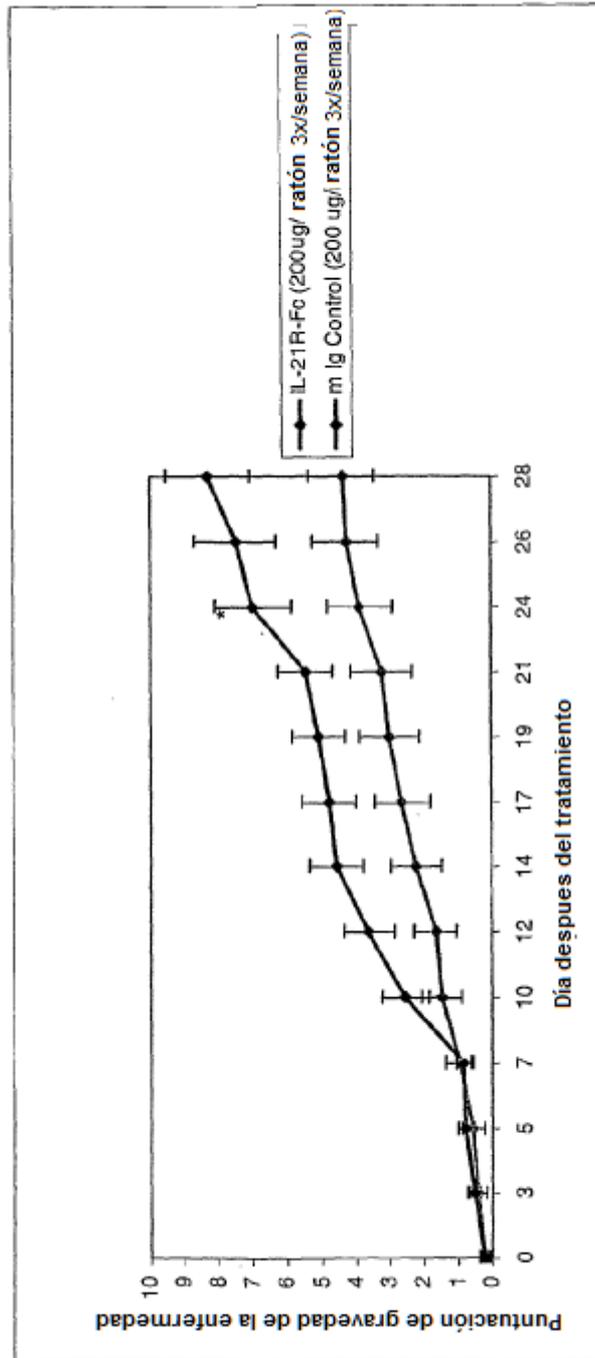


FIG.17

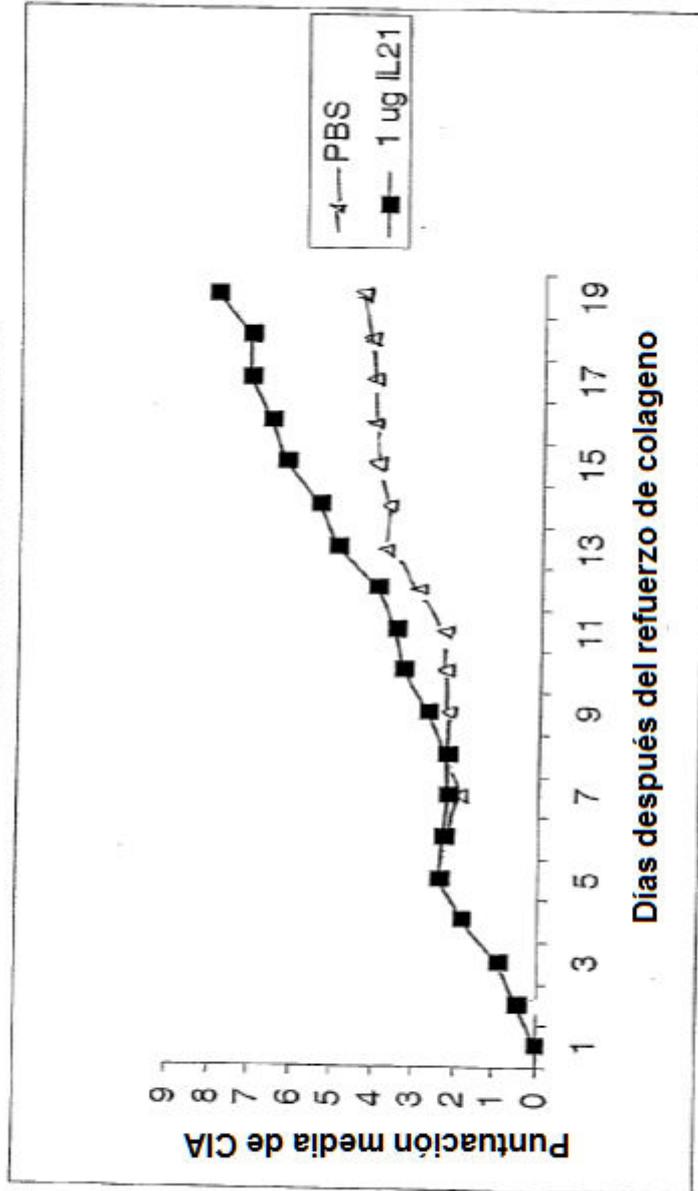


FIG.18

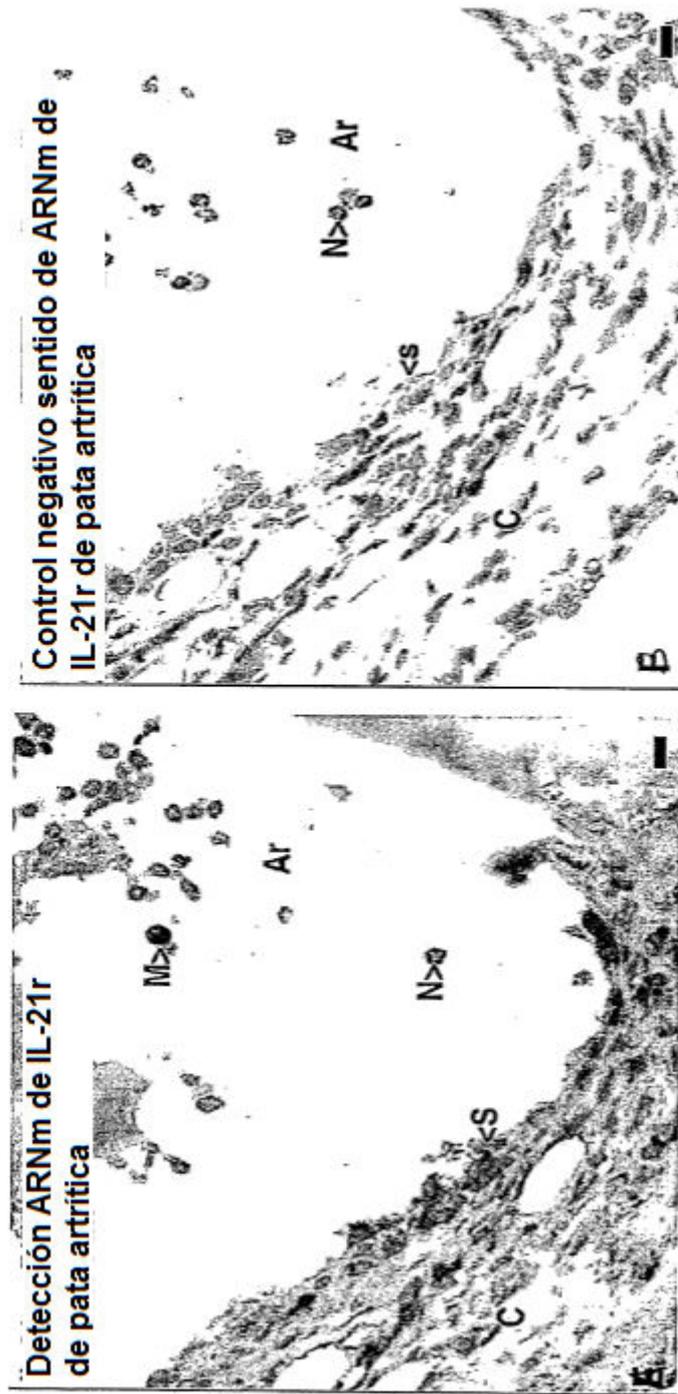
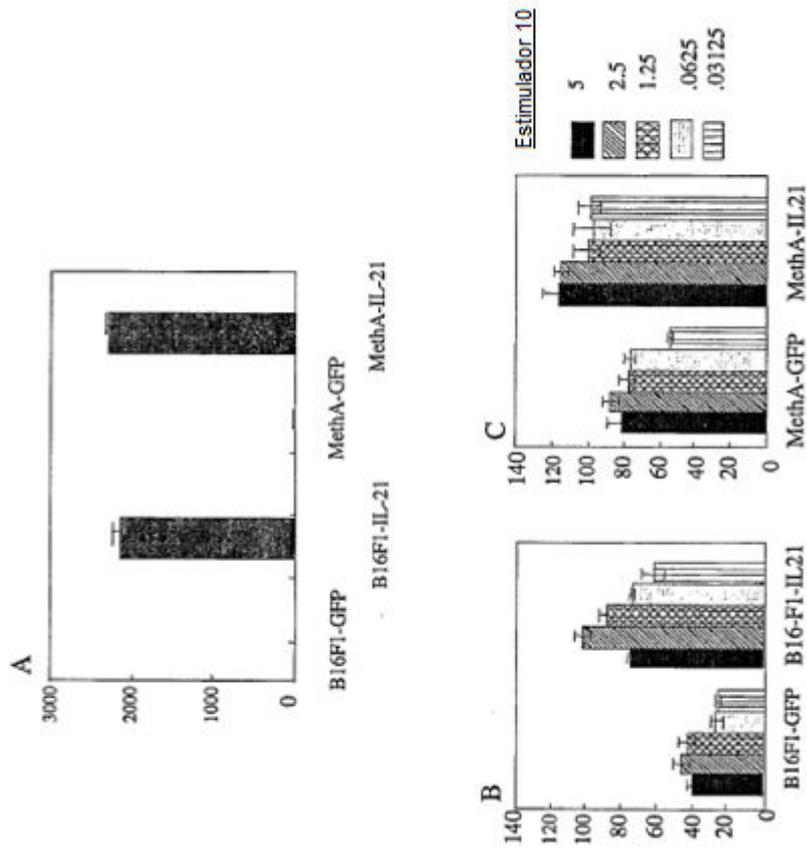
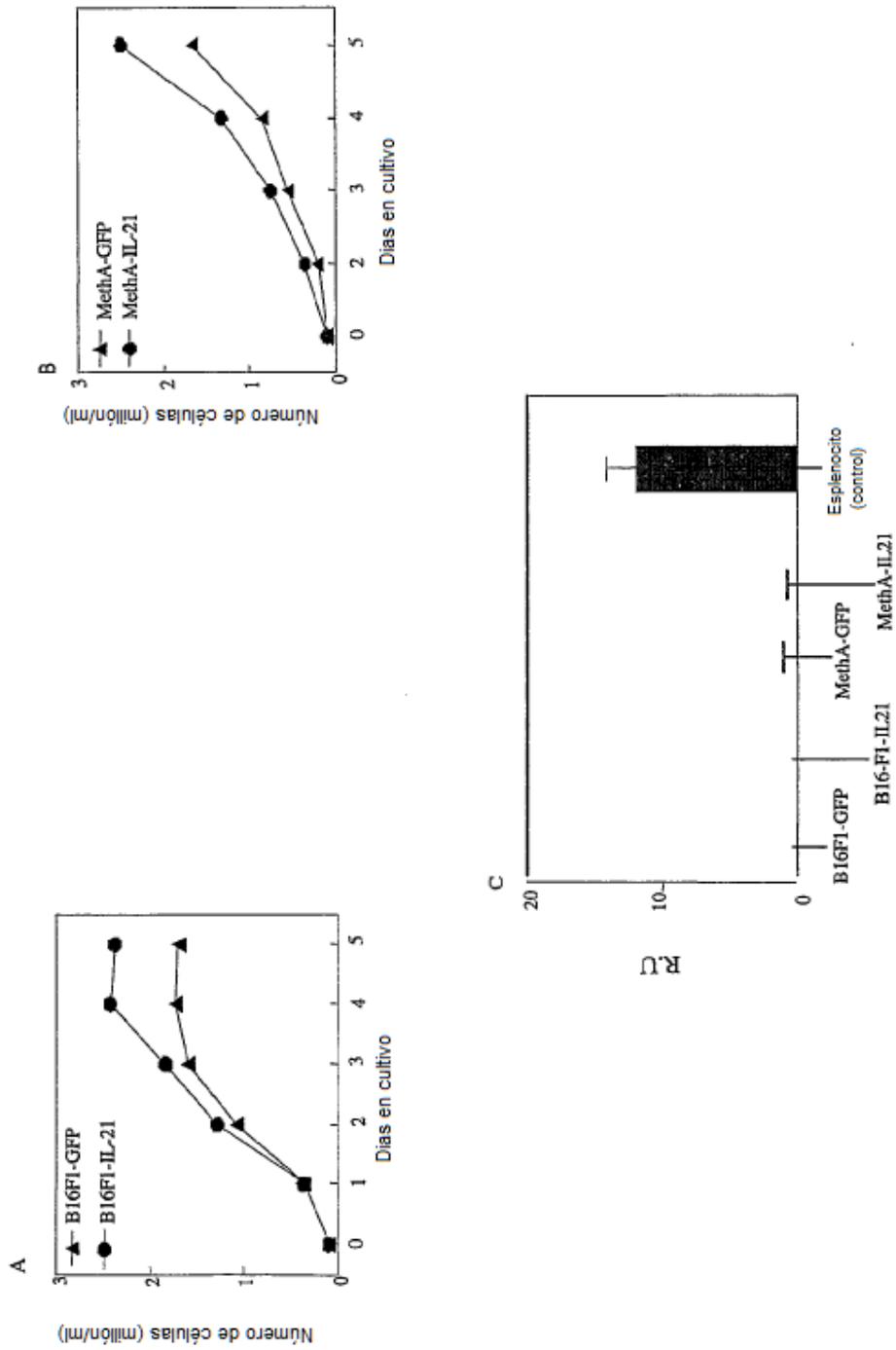


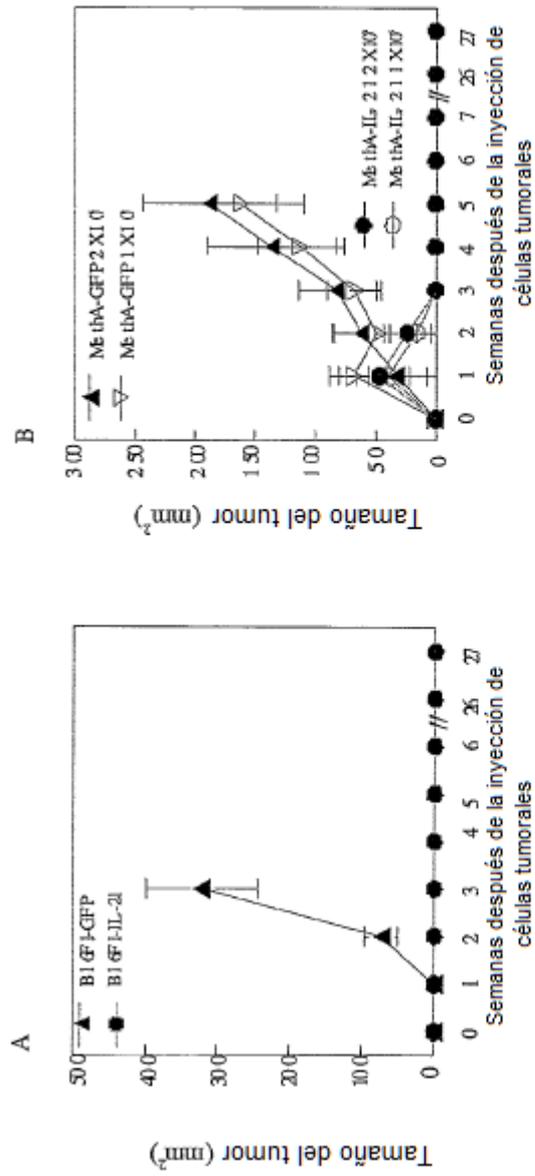
FIG.19



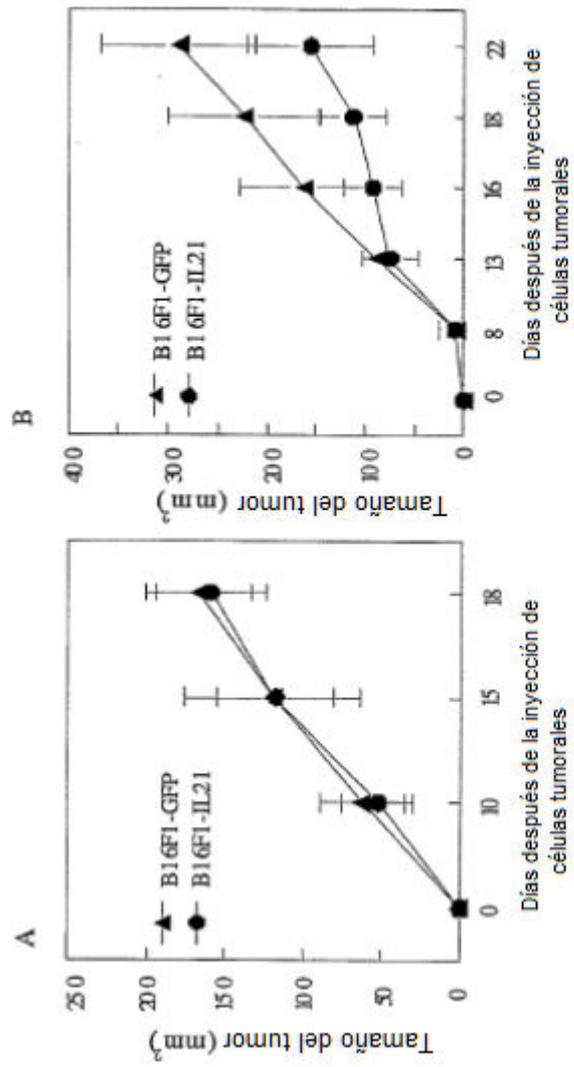
Figuras 20A-20C



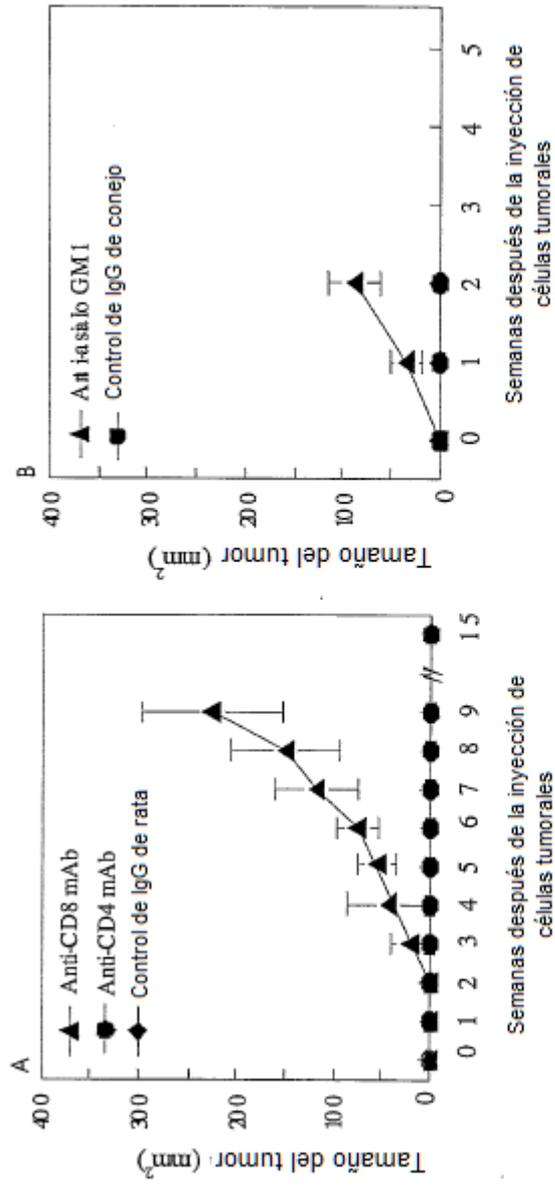
Figuras 21A-21C



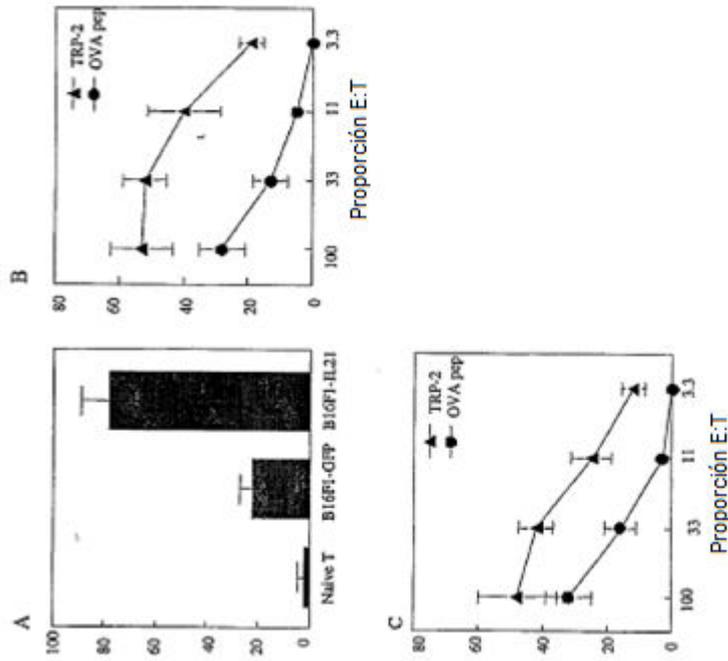
Figuras 22A-22B



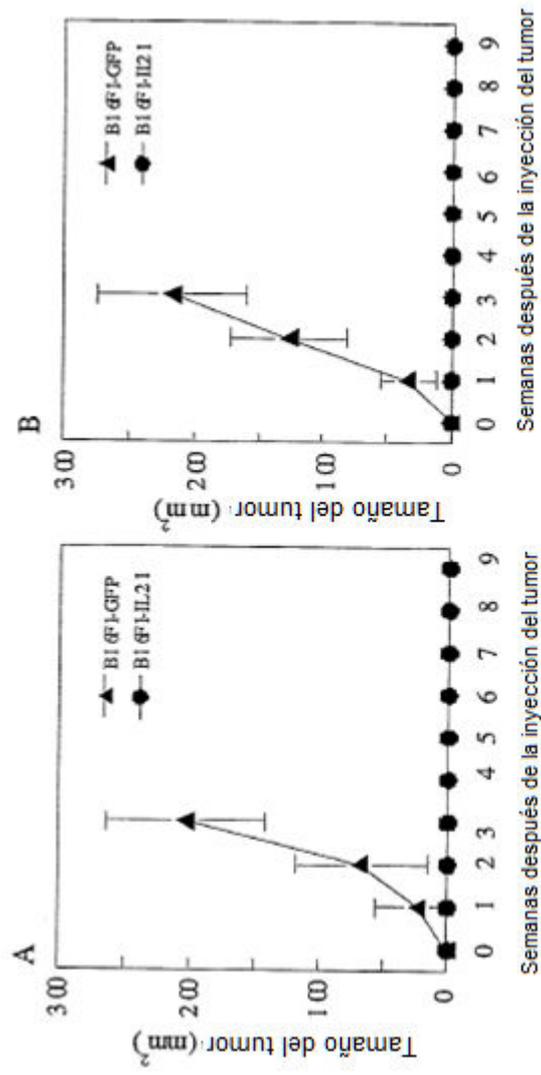
Figuras 23A-23B



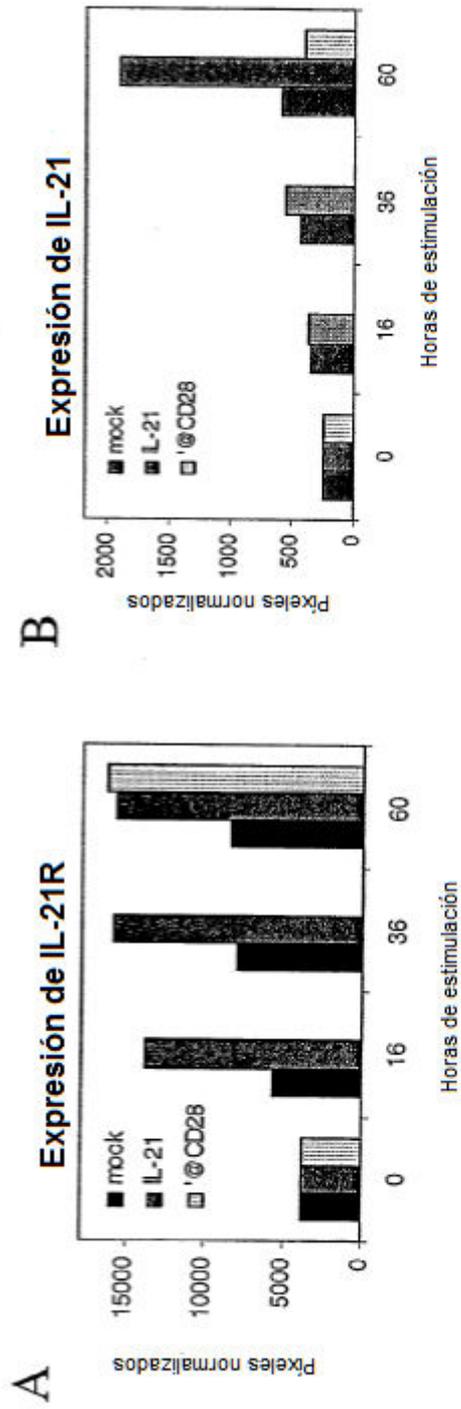
Figuras 24A-24B



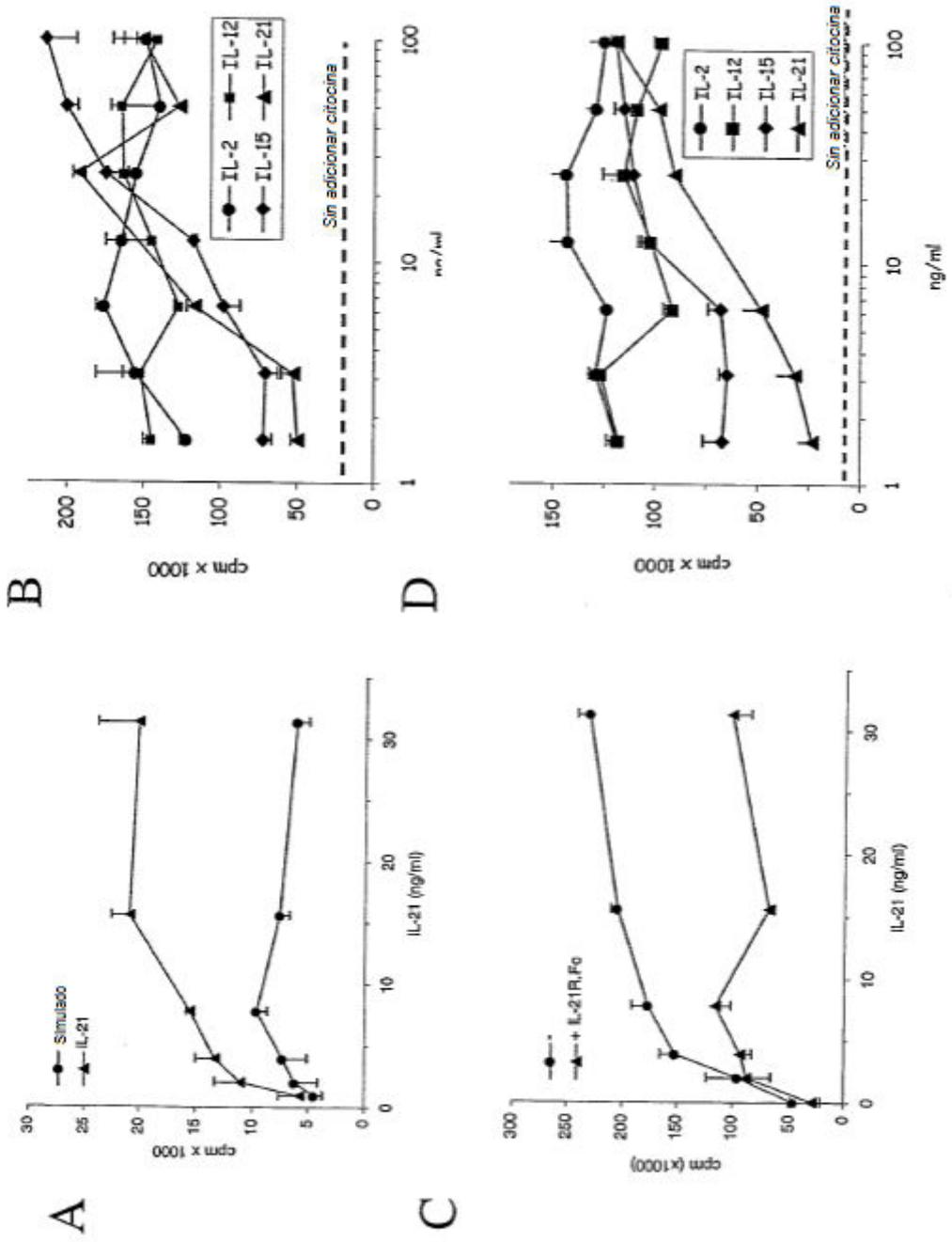
Figuras 25A-25C



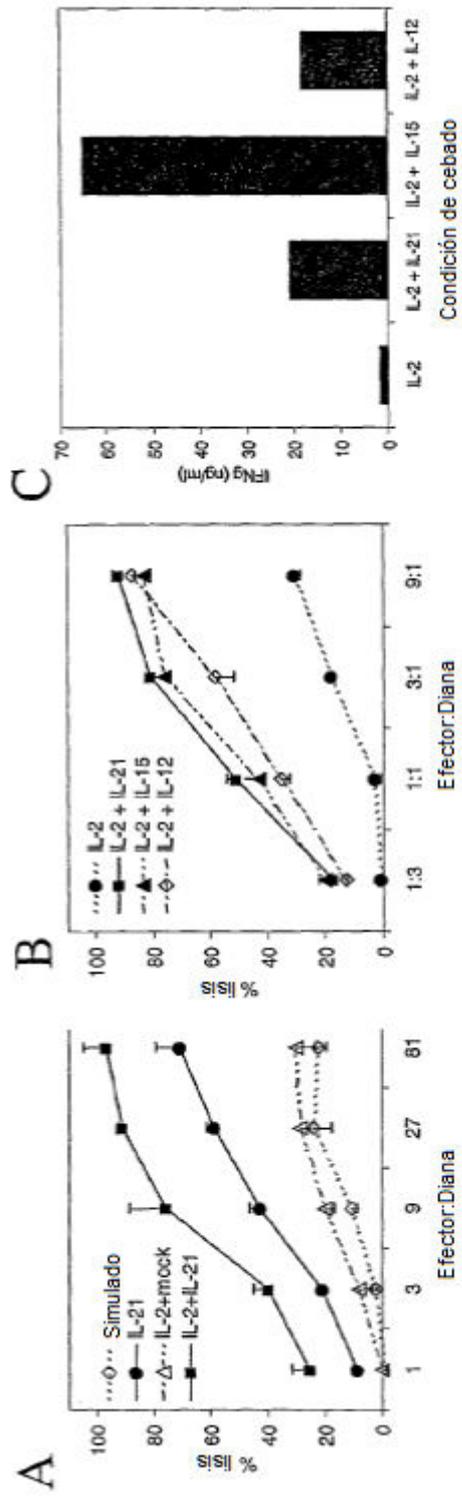
Figuras 26A-26B



Figuras 27A-27B



Figuras 28A-28D



Figuras 29A-29C