

B.T.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

05-9447

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO Métodos y composiciones para modular el
desarrollo y la función de las células T Helper (TH)

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL C12N

71. SOLICITANTE Wieth & President and Fellows of Harvard
College

DOMICILIO Cambridge, MA, Estados Unidos

74. APODERADO Dña Maria Rodriguez D'Alema

22. BOGOTA, D.C., Enero 31, 2005

✓

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 15-02-2005

1) SOLICITUD DE:

☒ Patente de invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

2) SOLICITANTE
(71)

Nombre: 1. WYETH
2. PRESIDENT AND FELLOWS OF
HARVARD COLLEGE

Dirección: 1. 6 Giralda Farms, Madison,
NJ 07940, Estados Unidos
2. 17 Quincy Street, Cambridge, MA 02138
USA

Nacionalidad o domicilio: 1. Madison, NJ,
Estados Unidos
2. Cambridge, MA, Estados Unidos

Lugar de constitución: 1. NJ, Estados
Unidos
2. MA, Estados Unidos

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT: ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

NÚMERO ☐ CUAL ☐

Teléfono: Fax:
E. Mail:

3) REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN
Dirección: Carrera 11 N°. 93-43 Of.
404 Bogotá D.C.

Teléfono: 6350835 Fax: 6350824
E. Mail:
clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT: ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

NÚMERO: 41.854.882
TP: 20824 CSJ

4) INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: 1. GRUSBY, Michael; 2. WURSTER, Andrea; 3. YOUNG,
Deborah, A.; 4. COLLINS, Mary; 5. WHITTERS, Matthew, J.
Dirección: 1. 5 Nightingale Path, Newton, MA 02459 USA; 2. 9
Rockmont Road, Arlington, MA 02474 USA; 3. 39 Nelson Road,
Melrose, MA 02176 USA; 4. 54 Rathburn Road, Natick, MA 02176
USA; 5. 14 Brenton Wood Road, Hudson MA 01749 USA.

Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores, estadounidenses

5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2003/021975 Fecha: Julio 15, 2003

Publicación Internacional No. WO 2004/007682 A2 Fecha: Enero 22, 2004

6) Título (54) MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA MODULAR EL DESARROLLO
Y LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS T HELPER (T_H)

7) Clasificación Internacional: C12N

8) PRIORIDAD

SI ☒ NO ☐

33) País de Origen

Estados Unidos

(32) Fecha

Julio 15, 2002

(31) Número de
Solicitud

60/396,160

Estados Unidos

Agosto 12, 2002

60/403,001

9) Comprobante de pago N°. 05-4,299 Fecha: Enero 19, 2005

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros:
 - 1. Reporte internacional de búsqueda
 - 2. Secuencias

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

12) Solicitud concesión de la patente.

NOMBRE: DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 05009447 00000000 Folios: 147
Fecha (GMD): 2005-02-03 16:24:56
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 4,299
FECHA : ENERO 19 DE 2005

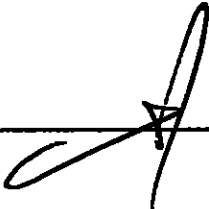
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PBO	Vr. PAGO
CLARKE NODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	35845904	19/01/2005	7,303,000.00

***** CONCEPTO *****

ANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE S.D.L. DE PATENTE DE IN	443,000.00
	TOTAL :	\$ 443,000.00

SOM: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
22 January 2004 (22.01.2004)

PCT

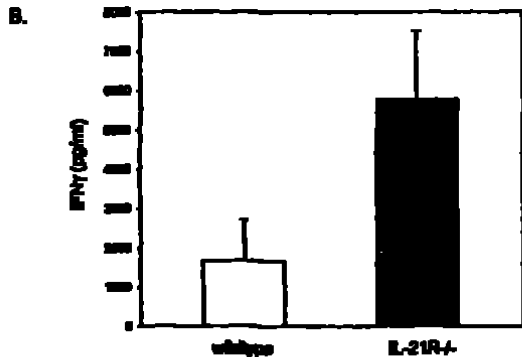
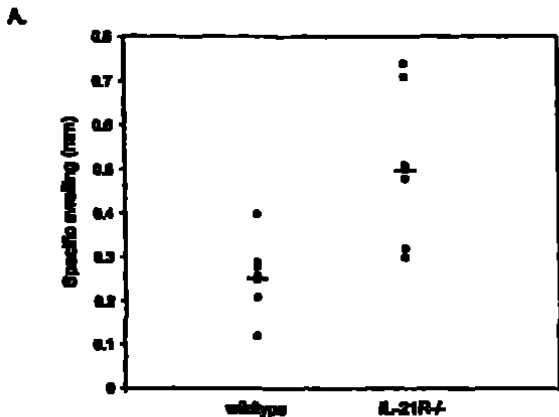
(10) International Publication Number
WO 2004/007682 A2

- (51) International Patent Classification⁷: C12N (71) Applicants (for all designated States except US): WYETH [US/US]; 5 Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US). PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE [US/US]; 17 Quincy Street, Cambridge, MA 02138 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US2003/021975
- (22) International Filing Date: 15 July 2003 (15.07.2003)
- (25) Filing Language: English (72) Inventors and
- (26) Publication Language: English (75) Inventors/Applicants (for US only): GRUSBY, Michael [US/US]; 5 Nightingale Path, Newton, MA 02459 (US). WURSTER, Andrea [US/US]; 9 Rockmont Road, Arlington, MA 02474 (US). YOUNG, Deborah, A. [US/US]; 39 Nelson Road, Melrose, MA 02176 (US). COLLINS, Mary [US/US]; 54 Rathburn Road, Natick, MA 02176 (US). WHITTERS, Matthew, J. [US/US]; 14 Brenton Wood Road, Hudson, MA 01749 (US).
- (30) Priority Data:
60/396,160 15 July 2002 (15.07.2002) US
60/403,001 12 August 2002 (12.08.2002) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:
US 60/403,001 (CIP)
Filed on 12 August 2002 (12.08.2002)
US 60/396,160 (CIP)
Filed on 15 July 2002 (15.07.2002)
- (74) Agent: ELRIFI, Ivor, R.; Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky, and Popeo P.C., One Financial Center, Boston, MA 02111 (US).

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR MODULATING T HELPER (T_H) CELL DEVELOPMENT AND FUNCTION

(57) Abstract: Methods and compositions for modulating T helper (T_H) cell development and function using modulators of IL-21, e.g., human IL-21, activity or level.



WO 2004/007682 A2



(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

METHODS AND COMPOSITIONS FOR MODULATING T HELPER (T_H) CELL DEVELOPMENT AND FUNCTION

5

FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to modulators of IL-21, e.g., human IL-21, activity or levels and their uses in modulating T cell, e.g., T helper (Th) cell, development and function.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

T helper (Th) subsets are distinguished by their ability to produce distinct cytokine patterns and promote specific immune responses. Th1 cells produce IFN γ and promote cell-mediated immunity directed towards intracellular pathogens. In contrast, Th2 cells produce the
15 cytokines IL-4, IL-5, and IL-13, activate mast cells and eosinophils and direct B cells against extracellular pathogens. Dysregulation of Th responses can result in immunopathology in that aberrant Th1 responses can be responsible for organ-specific autoimmunity, and exaggerated Th2 responses have been associated with allergic diseases.

The specific cytokines produced by polarized Th cells are the primary effectors that
20 promote differentiation of precursor Th cells, but these cells also cross-regulate the other subset's functional activity. For example IL-4 is reported to be a potent factor in promoting the differentiation of Thp cells to Th2 effectors. In addition, IL-4 antagonizes production of IFN γ . IL-10, another cytokine produced by Th2 cells, has also been described to inhibit Th1
25 development and IFN γ -induced macrophage function. Conversely, the IFN γ produced by Th1 cells amplifies Th1 development and inhibits the expansion of Th2 cells. The ability of these cytokines to promote to promote development of specific Th cell subsets, while simultaneously inhibiting the alternate developmental fate, results in a progressively polarized response.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention is based in part on the discovery that the cytokine interleukin-21 (IL-21) is expressed by a subset of T helper (Th) cells, Th2 cells, and selectively inhibits interferon γ (IFN γ) levels during Th1 cell development. More specifically, it is herein shown that IL-21 is preferentially expressed by Th2 cells generated *in vitro* and *in vivo*. In one embodiment, exposure of developing Th cells to IL-21 specifically reduced IFN γ levels from developing Th1 cells, and thus potentiated Th2 responses. In addition, exposure of developing Th cells to IL-21 reduces Stat4 signaling, e.g., by reducing Stat4 protein and/or mRNA expression, thereby modulating Th cell responsiveness to other cytokines, e.g., IL-12. Thus, methods and compositions for modulating Th cell development and activity are disclosed. The methods and compositions, e.g., agonists or antagonists of IL-21, described herein are useful in treating (e.g., curing, ameliorating, delaying or preventing the onset of, or preventing recurrence or relapse of), or preventing, Th cell- and/or IFN γ - associated disorders or conditions, such as Th2-associated disorders, e.g., asthma, allergy, and disorders associated with antibody components (e.g., rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and lupus); and Th1-associated disorders, e.g., autoimmune disorders (e.g., multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, type I diabetes, Crohn's disease, psoriasis and myasthenia gravis, among others).

In one aspect, the invention features a method for inhibiting, e.g., reducing or eliminating, interferon gamma (IFN γ) levels in a T cell or cell population. The method provides, for example, inhibiting IFN γ activity, expression, secretion, or processing in a T cell, e.g., a T cell precursor cell (a Thp cell), or a Th1 cell (e.g., a differentiating Th1 cell or an effector Th cell), or in a T cell population thereof. The method includes contacting the T cell or cell population with an IL-21 agonist in an amount sufficient to inhibit IFN γ (e.g., reduce or eliminate) in the T cell or cell population, such that the agonist is an IL-21 polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least 85% identical to SEQ ID NO: 2, and which is capable of binding to an IL-21R.

6

In some embodiments, the method further includes identifying a T cell or cell population in which inhibition of IFN γ levels is desired.

In another aspect, the invention features a method for promoting differentiation of a Th precursor (Thp) cell or cell population into a Th2 cell or cell population. In one embodiment, the method includes contacting the Thp cell or cell population with an IL-21 agonist in amount sufficient to induce differentiation of the Thp cell or cell population into a Th2 cell or cell population, and the agonist is an IL-21 polypeptide having an amino acid sequence that is at least 85% identical to SEQ ID NO: 2 and which is capable of binding to an IL-21R. In some embodiments, the method further includes identifying a Thp cell or cell population in which differentiation into a Th2 cell or cell population is desired.

In another aspect, the invention features a method of inhibiting differentiation of a Thp cell or cell population into a Th1 cell or cell population. The method includes contacting the Thp cell or cell population with an IL-21 agonist in an amount sufficient to inhibit differentiation of the Thp cell or cell population into a Th1 cell or cell population, and the agonist is an IL-21 polypeptide having an amino acid sequence that is at least 85% identical to SEQ ID NO: 2 and which is capable of binding to an IL-21R. In one embodiment, this method further includes identifying a T cell population in which inhibition of differentiation of the Thp cell or cell population into a Th1 cell or cell population is desired.

In some embodiments of these methods, the polypeptide includes the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. In some embodiments of these methods, the contacting step is carried out ex vivo, in vitro, or in vivo. A suitable subject for ex vivo or in vivo methods includes a mammalian subject, for example, a human.

In another aspect, the invention features a method for inhibiting differentiation of a Th precursor (Thp) cell or cell population into a Th2 cell or cell population. The method includes

contacting the Thp cell or population with an antagonist of an interleukin-21 (IL-21)/IL-21 receptor (IL-21R) in an amount sufficient to inhibit differentiation of the Thp cell or cell population into the Th2 cell population, and the antagonist is selected from the group consisting of an anti-IL21R antibody, an antigen-binding fragment of an anti-IL21R antibody and a soluble fragment of an IL-21R. The method optionally further includes identifying a T cell or cell population in which an inhibition of differentiation of Thp cell or cell population into a Th2 cell or cell population is desired. In some embodiment, the T cell population includes at least one Th1 cell.

In some embodiments, the soluble fragment of an IL-21R includes an extracellular region of an IL-21 Receptor. For example, the soluble fragment can include an amino acid sequence at least 85% identical to amino acids 20 to 235 of SEQ ID NO: 4 and which is capable of binding IL-21; alternatively, the soluble fragment includes amino acids 1 to 235 of SEQ ID NO:4. In related embodiments, the soluble fragment further includes an Fc fragment. In yet another embodiment, the antagonist is an anti-IL21R antibody or an antigen-binding fragment of the anti-IL21R antibody.

In yet another embodiment, the contacting step is carried out ex vivo, in vitro or in vivo. The contacting step can be carried out in a mammalian subject, for example, the mammalian subject is a human.

In another aspect, the invention features a method for increasing interferon gamma (IFN γ) levels in a T cell or cell population. The method in one embodiment includes contacting the T cell or cell population with an antagonist of an IL-21/IL-21R in an amount sufficient to increase IFN γ levels in the T cell or cell population, and the antagonist is selected from the group consisting of an anti-IL21R antibody, an antigen-binding fragment of an anti-IL21R antibody and a soluble fragment of an IL-21R. An embodiment of this method further includes identifying a T cell population in which an increase in IFN γ levels is desired.

7

In some embodiments, the soluble fragment of an IL-21R includes an extracellular region of an IL-21 Receptor. For example, in some embodiments the soluble fragment comprises an amino acid sequence at least 85% identical to amino acids 20 to 235 of SEQ ID NO: 4 and which is capable of binding IL-21; alternatively, the soluble fragment includes amino acids 1 to 235 of SEQ ID NO:4. In related embodiments, the soluble fragment further includes an Fc fragment. In yet another embodiment, the antagonist can be an anti-IL21R antibody or an antigen-binding fragment of the anti-IL21R antibody.

In yet another related embodiment, the contacting step is carried out ex vivo, in vitro or in vivo. In some embodiments, the contacting step is performed in a mammalian subject, for example, a human.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the invention, suitable methods and materials are described below. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In the case of conflict, the present specification, including definitions, will control. In addition, the materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description and claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1A is a representation of a Northern blot hybridization analysis examining expression of IL-21, IL-4, IFN γ , and γ actin under the various Th1 and Th2 skewing conditions described in the appended Examples.

FIG. 1B is a histogram showing the level of IL-21 mRNA relative to GAPDH mRNA in Th1 and Th2 cells following primary and secondary stimulation.

FIG. 1C is a histogram showing the level of IL-21 mRNA relative to GAPDH mRNA in primary and secondary Th1 and Th2 cells cultured in the presence or absence of IL-4 and IFN γ .

5 FIG. 1D is a histogram showing the level of IL-21 mRNA, IL-4 mRNA, and IFN γ mRNA relative to GAPDH mRNA in C57BL/g and BALB/c mice following infection with *L. major*.

FIG. 2A is a graphic representation of IL-4 and IL-21 cytokine production in Thp cells cultured under neutral conditions, or Th1 skewing conditions.

10 FIG. 2B is a histogram showing IFN γ production in IL-21 treated or mock treated Thp cells.

FIG. 3A is a graphic representation of IL-4 and IFN γ production in Thp cells cultured under Th1 skewing conditions in the presence or absence of IL-22.

FIG. 3B is a graphic representation of IL-4 and IFN γ production in IL-21 treated or mock treated Thp cells treated in Th1 skewing conditions from wild-type and Stat6^{-/-} mice.

15 FIG. 3C is a graphic representation of IFN γ , IL-2, and TNF α expression in IL-21 treated or mock treated Th1 cells from wild-type and Stat6^{-/-} mice.

FIG. 4A is a representation of a western blot analysis of T-bet and actin protein levels in Thp cells cultured under Th1 or Th2 skewing conditions.

20 FIG. 4B is a histogram showing relative levels of IL-12R β 2 mRNA relative to levels in Th1 cells.

FIG. 4C is a representation of a western blot analysis of phosphorylated Stat4, Stat4, Stat1, and IL-12 polypeptide levels in Thp cells stimulated with anti-CD3 in the presence of IL-21 or mock supernatants.

FIG. 4D is a histogram showing levels of Stat4 mRNA relative to GAPDH mRNA in mock treated and IL-21 Thp cells stimulated with anti-CD3 for 48 hours in the presence of IL-21 or mock supernatants. IL-4 mRNA and IFN γ .

FIG. 5A is a graph showing specific swelling in TNP-KLH-immunized wild type and IL21-21R $^{-/-}$ mice subsequently injected with TNP-KLH or PBS.

FIG. 5B is a histogram showing IFN γ production in CD4 $^{+}$ T cells purified from draining lymph nodes of TNP-KLH-immunized wild type and IL21-21R $^{-/-}$ mice restimulated by antigen.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention provides methods and compositions for modulating T helper cell differentiation, development and activity by modulating the interaction between IL-21 and an IL-21 receptor. IL-21, or agents that increase IL-21 or IL-21 receptor levels in a cell population, are added to a population of T helper cells to suppress IFN γ levels in a population of Thp or Th1 cells. IL-21, or agents that increase IL-21 levels, can also be used to promote Th2 development, or to potentiate Th2-mediated immune responses and/or to suppress Th1 development.

IL-21, or agents that increase IL-21 levels, can also be used to inhibit the effects of IL-12 on the T helper cell population. IL-21 or agents that increase levels of IL-21 or otherwise act as IL-21 agonists, can be used to suppress Th1 mediated diseases such as autoimmune diseases, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, and type I diabetes.

In one aspect, the invention features a method for modulating, e.g., increasing, or reducing or inhibiting, the activity or level of interferon gamma (IFN γ) in a cell, e.g., a T cell, or a cell population, e.g., a T cell population. For example, a method for modulating one or more of: IFN γ activity, expression, secretion, or processing, in a T cell, e.g., a T cell precursor cell (a Thp cell), or a Th1 cell (e.g., a differentiating Th1 cell or an effector Th cell), or a T cell population thereof, is provided. The method includes:

(optionally) identifying a cell, e.g., a T cell, or a cell population, e.g., a T cell population, in which modulation (e.g., increase or reduction) of the activity or level of IFN γ is desired; and

contacting said cell or cell population with an amount of an IL-21 modulator, e.g., an IL-21 agonist or antagonist, sufficient to modulate (e.g., increase or reduce) the activity or level of IFN γ in said cell or cell population.

The subject method can be used on cells in culture, e.g. *in vitro* or *ex vivo*. For example, immune cells, e.g., T cells as described herein, can be cultured *in vitro* in culture medium and the contacting step can be effected by adding one or more IL-21 modulators (e.g., an IL-21 agonist or antagonist), to the culture medium. Alternatively, the method is performed on cells (e.g., immune or T cells as described herein) present in a subject, e.g., as part of an *in vivo* (e.g., therapeutic or prophylactic) protocol.

In one embodiment, a method for reducing or inhibiting the activity or level of IFN γ in a cell, e.g., a T cell (e.g., a T cell precursor cell (a Thp cell), or a Th1 cell (e.g., a differentiating Th1 cell or an effector Th cell)), or a cell population thereof is provided. The method includes (optionally) identifying a cell, e.g., a T cell, or a cell population, e.g., a T cell population, in which reduction or inhibition of the activity or level of IFN γ is desired; and contacting said cell or cell population with an amount of an IL-21 agonist, sufficient to reduce or inhibit the activity or level of IFN γ in said cell or cell population. Preferably, the IL-21 agonist specifically inhibits IFN γ levels or activity, e.g., it does not reduce or inhibit the activity or level of other cytokines such IL-2 or TNF α . In one embodiment, the IL-21 agonist inhibits production of IFN γ by an IFN γ -producing cell, e.g., an IFN γ -producing Th1 cell.

In other embodiments, the invention provides a method for reducing IFN γ levels or activity in a subject. The method includes (optionally) identifying a subject in which reduction of IFN γ levels or activity is desired; and administering to said subject an amount of an IL-21 agonist sufficient to reduce the levels or activity IFN γ . IFN γ can be measured using techniques known in the art, for example, intracellular cytokine staining, or an ELISA technique to determine levels in cell supernatants.

The IL-21 agonist can be an IL-21 polypeptide, a human IL-21 polypeptide, or an active fragment thereof (e.g., a human IL-21 polypeptide comprising the amino acid sequence shown as SEQ ID NO:2, or encoded by a nucleotide sequence shown as SEQ ID NO:1, or a sequence

substantially homologous thereto). In other embodiments, the IL-21 agonist is a fusion protein comprising an IL-21 polypeptide, e.g., human IL-21 polypeptide, or a fragment thereof fused to another polypeptide, e.g., an immunoglobulin polypeptide or a portion thereof (e.g., an Fc region of an immunoglobulin polypeptide); an agonist antibody to the IL-21 receptor; or a small molecule agonist. In other embodiments, the IL-21 agonist is an agent that increases the activity or level of IL-21 by, e.g., increasing expression, processing and/or secretion of functional IL-21.

Preferably, the subject is a mammal, e.g., a human subject suffering from a disorder associated with aberrant, e.g., increased, IFN γ levels or activity, e.g., an immune disorder (e.g., a T cell-mediated disorder), in an amount sufficient to ameliorate or prevent said disorder.

Exemplary immune disorders that can be treated (e.g., ameliorated) or prevented using agonists of IL-21 include, for example, Th1-associated disorders, such as autoimmune disorders (including, but not limited to, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, type 1 diabetes, inflammatory bowel disease (IBD), psoriasis and myasthenia gravis.

The invention additionally features a method of increasing IFN γ levels or activity in a cell, e.g., a T-cell, or a cell population, e.g., a T cell population. For example, the invention includes method for increasing IFN γ activity, expression, secretion, or processing, in a T cell, e.g., a T cell precursor cell (a Thp cell), or a Th1 cell (e.g., a differentiating Th1 cell or an effector Th cell), or a T cell population thereof. The method includes (optionally) identifying a cell, e.g., a T cell, or cell population, e.g., a T cell population, in which an increase in IFN γ expression is desired; and contacting said cell with an IL-21 antagonist in an amount sufficient to inhibit binding or activity of IL-21, e.g., inhibit binding of IL-21 to an IL-21 receptor, thereby increasing IFN γ expression levels in said cell.

The IL-21 antagonist can be, e.g., an antibody (e.g., a monoclonal or single specificity antibody) to IL-21, e.g., human IL-21, or an IL-21 receptor, e.g., human IL-21 receptor polypeptide. Preferably, the antibody is a human, humanized, chimeric, or *in vitro* generated antibody to human IL-21 or human IL-21 receptor polypeptide. In other embodiments, the antagonist includes a fragment of an IL-21 polypeptide, e.g., an IL-21 receptor binding domain of an IL-21 polypeptide. Alternatively, the antagonist includes a fragment of an IL-21 receptor

polypeptide, e.g., an IL-21 binding domain of an IL-21 receptor polypeptide. In one embodiment, the antagonist is a fusion protein comprising the aforesaid IL-21 or IL-21 receptor polypeptides or fragments thereof fused to a second moiety, e.g., a polypeptide (e.g., an immunoglobulin chain).

5 In another aspect, the invention features a method for modulating, e.g., increasing or decreasing, Th2 cell activity and/or cell number. In one embodiment, a method of modulating, e.g., promoting or inhibiting, one or more of proliferation, survival and/or differentiation into (e.g., differentiation of a T cell precursor, e.g., a Th precursor (Thp), into) a Th2 cell is provided. The method includes:

10 (optionally) identifying a cell, e.g., a T cell (e.g., a Thp or a Th2 cell), or a cell population, where modulation of proliferation, survival and/or differentiation is desired; and contacting said cell or cell population with an IL-21 modulator, e.g., an IL-21 agonist or antagonist, in an amount sufficient to modulate one or more of proliferation, survival and/or differentiation into (e.g., modulating differentiation of said Thp cell into a Th2 cell) a Th2 cell, 15 thereby modulating Th2 cell activity and/or cell number.

The subject method can be used on cells in culture, e.g. *in vitro* or *ex vivo*. For example, immune cells, e.g., T cells as described herein, can be cultured *in vitro* in culture medium and the contacting step can be effected by adding one or more IL-21 modulators (e.g., one or more IL-21 agonists or antagonists) to the culture medium. Alternatively, the method can be performed on 20 cells (e.g., immune or T cells as described herein) present in a subject, e.g., as part of an *in vivo* (e.g., therapeutic or prophylactic) protocol.

In one embodiment, a method of reducing or inhibiting Th2 cell activity and/or cell number is provided. For example, Th2 cell activity and/or cell number can be reduced or inhibited by inhibiting or reducing one or more of proliferation, survival and/or differentiation 25 into (e.g., differentiation of a T cell precursor, e.g., a Th precursor (Thp), into) a Th2 cell. The method includes (optionally) identifying a cell, e.g., a T cell (e.g., a Thp or a Th2 cell), or a cell population, where inhibition of proliferation, survival and/or differentiation is desired; and

contacting said cell or cell population with an IL-21 antagonist in an amount sufficient to inhibit or reduce one or more of proliferation, survival and/or differentiation into (e.g., inhibiting or reducing differentiation of said Thp cell into a Th2 cell) a Th2 cell, thereby inhibiting or reducing Th2 cell activity and/or cell number.

5 The subject method can be used on cells, e.g., T cells (e.g., Thp or Th2 cells) in culture, e.g. *in vitro* or *ex vivo*.

Alternatively, the method can be performed on cells (e.g., immune or T cells as described herein) present in a subject, e.g., as part of an *in vivo* (e.g., therapeutic or prophylactic) protocol. For example, the method can be used to treat or prevent a Th2-mediated disorder, e.g., asthma and allergy, in a subject. Accordingly, the invention provides a method of treating (e.g., curing, suppressing, ameliorating, delaying or preventing the onset of, or preventing recurrence or relapse of) or preventing a Th2-associated disorder in a subject. The method includes administering to a subject an IL-21 antagonist in an amount sufficient to inhibit or reduce Th2 cell activity and/or cell number, thereby treating or preventing a Th2-associated disorder.

15 Preferably, the subject is a mammal, e.g., a human suffering from a disorder associated with aberrant Th2 cell number or activity, e.g., an immune disorder (e.g., a Th2-associated disorder). The amount sufficient to inhibit or reduce the cell activity and/or number is an amount sufficient to ameliorate or prevent said disorder.

20 The IL-21 antagonist can be, e.g., an antibody (e.g., a monoclonal or single specificity antibody) to IL-21, e.g., human IL-21, or an IL-21 receptor, e.g., human IL-21 receptor polypeptide. Preferably, the antibody is a human, humanized, chimeric, or *in vitro* generated antibody to human IL-21 or human IL-21 receptor polypeptide. In other embodiments, the antagonist includes a fragment of an IL-21 polypeptide, e.g., an IL-21 receptor binding domain of an IL-21 polypeptide. Alternatively, the antagonist includes a fragment of an IL-21 receptor polypeptide, e.g., an IL-21 binding domain of an IL-21 receptor polypeptide. In one
25 embodiment, the antagonist is a fusion protein comprising the aforesaid IL-21 or IL-21 receptor polypeptides or fragments thereof fused to a second moiety, e.g., a polypeptide (e.g., an immunoglobulin chain).

In yet another embodiment, a method of increasing Th2 cell activity and/or cell number is provided. For example, Th2 cell activity and/or cell number can be increased by increasing one or more of proliferation, survival and/or differentiation into (e.g., differentiation of a T cell precursor, e.g., a Th precursor (Thp), into), a Th2 cell. The method includes (optionally) identifying a cell, e.g., a T cell (e.g., a Thp or a Th2 cell), or a cell population, where increased proliferation, survival and/or differentiation is desired; and contacting said cell or cell population with an IL-21 agonist in an amount sufficient to increase one or more of proliferation, survival and/or differentiation into, (e.g., increase differentiation of said Thp cell into a Th2 cell) a Th2 cell, thereby increasing Th2 cell activity and/or cell number.

The IL-21 agonist can be an IL-21 polypeptide, e.g., a human IL-21 polypeptide, or an active fragment thereof (e.g., a human IL-21 polypeptide comprising the amino acid sequence shown as SEQ ID NO:2, or encoded by a nucleotide sequence shown as SEQ ID NO:1, or a sequence substantially homologous thereto). In other embodiments, the IL-21 agonist is a fusion protein comprising an IL-21 polypeptide, e.g., human IL-21 polypeptide, or a fragment thereof fused to another polypeptide, e.g., an immunoglobulin polypeptide or a portion thereof (e.g., an Fc region of an immunoglobulin polypeptide); an agonist antibody to the IL-21 receptor; or a small molecule agonist.

In yet another aspect, a method for modulating, e.g., increasing or decreasing, Th1 cell number and/or activity is provided. In one embodiment, a method of modulating, e.g., promoting or inhibiting, one or more of proliferation, survival and/or differentiation into (e.g., differentiation of a T cell precursor, e.g., a Th precursor (Thp), into), a Th1 cell is provided. The method includes (optionally) identifying a cell, e.g., a T cell (e.g., a Thp or a Th1 cell), or a cell population, where modulation of proliferation, survival and/or differentiation is desired; and contacting said cell or cell population with an IL-21 modulator, e.g., an agonist or an antagonist, in an amount sufficient to modulate one or more of proliferation, survival and/or differentiation into, (e.g., modulate differentiation of said Thp cell into a Th1 cell) a Th1 cell, thereby modulating Th1 cell activity and/or cell number.

01

The subject method can be used on cells in culture, e.g. *in vitro* or *ex vivo*. For example, immune cells, e.g., T cells as described herein, can be cultured *in vitro* in culture medium and the contacting step can be effected by adding one or more IL-21 modulators (e.g., an IL-21 agonist or antagonist), to the culture medium. Alternatively, the method can be performed on cells (e.g., immune or T cells as described herein) present in a subject, e.g., as part of an *in vivo* (e.g., therapeutic or prophylactic) protocol.

In one embodiment, a method of reducing or inhibiting Th1 cell activity and/or cell number is provided. For example, Th1 cell activity and/or cell number can be reduced or inhibited by inhibiting or reducing one or more of proliferation, survival and/or differentiation into (e.g., differentiation of a T cell precursor, e.g., a Th precursor (Thp), into), a Th1 cell. The method includes (optionally) identifying a cell, e.g., a T cell (e.g., a Thp, a cell producing IFN γ , e.g., a Th1 cell), or a cell population, where inhibition of proliferation, survival and/or differentiation is desired; and contacting said cell or cell population with an IL-21 agonist in an amount sufficient to inhibit or reduce one or more of proliferation, survival and/or differentiation into, (e.g., inhibiting or reducing differentiation of said Thp cell into a Th1 cell) a Th1 cell, thereby inhibiting or reducing Th1 cell activity and/or cell number.

The subject method can be used on cells, e.g., T cells (e.g., Thp or Th2 cells) in culture, e.g. *in vitro* or *ex vivo*.

Alternatively, the method can be performed on cells (e.g., immune or T cells as described herein) present in a subject, e.g., as part of an *in vivo* (e.g., therapeutic or prophylactic) protocol. For example, the method can be used to treat or prevent a Th1-mediated disorder, e.g., an autoimmune disorder (e.g., multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, type I diabetes, Crohn's disease, psoriasis and myasthenia gravis, among others), in a subject. Accordingly, the invention provides a method of treating (e.g., curing, suppressing, ameliorating, delaying or preventing the onset of, or preventing recurrence or relapse of) or preventing a Th1-associated disorder in a subject. The method include administering to a subject an IL-21 agonist in an amount sufficient to inhibit or reduce Th1 cell activity and/or cell number, thereby treating or preventing a Th1-associated disorder.

Preferably, the subject is a mammal, e.g., a human suffering from a disorder associated with aberrant Th1 cell number or activity, e.g., an immune disorder (e.g., a Th1-associated disorder as described herein). An amount sufficient to inhibit or reduce TH1 cell activity and/or cell member is an amount sufficient to ameliorate or prevent said disorder.

5 The IL-21 agonist can be an IL-21 polypeptide, e.g., a human IL-21 polypeptide, or an active fragment thereof (e.g., a human IL-21 polypeptide comprising the amino acid sequence shown as SEQ ID NO:2, or encoded by a nucleotide sequence shown as SEQ ID NO:1, or a sequence substantially homologous thereto). In other embodiments, the IL-21 agonist is a fusion protein comprising an IL-21 polypeptide, e.g., human IL-21 polypeptide, or a fragment thereof
10 fused to another polypeptide, e.g., an immunoglobulin polypeptide or a portion thereof (e.g., an Fc region of an immunoglobulin polypeptide); an agonist antibody to the IL-21 receptor; or a small molecule agonist. In other embodiments, the IL-21 agonist is an agent that increases the activity or level of IL-21 by, e.g., increasing expression, processing and/or secretion of functional IL-21.

15 In yet another embodiment, a method of increasing Th1 cell activity and/or cell number is provided. For example, Th1 cell activity and/or cell number can be increased by increasing one or more of proliferation, survival and/or differentiation into (e.g., differentiation of a T cell precursor, e.g., a Th precursor (Thp), into), a Th1 cell. The method includes:

20 (optionally) identifying a cell, e.g., a T cell (e.g., a Thp or a Th1 cell), or a cell population, where increased proliferation, survival and/or differentiation is desired; and
 contacting said cell or cell population with an IL-21 antagonist in an amount sufficient to increase one or more of proliferation, survival and/or differentiation into, (e.g., increase differentiation of said Thp cell into a Th1 cell) a Th1 cell, thereby increasing Th1 cell activity and/or cell number.

25 The IL-21 antagonist can be, e.g., an antibody (e.g., a monoclonal or single specificity antibody) to IL-21, e.g., human IL-21, or an IL-21 receptor, e.g., human IL-21 receptor polypeptide. Preferably, the antibody is a human, humanized, chimeric, or *in vitro* generated antibody to human IL-21 or human IL-21 receptor polypeptide. In other embodiments, the

12

antagonist includes a fragment of an IL-21 polypeptide, e.g., an IL-21 receptor binding domain of an IL-21 polypeptide. Alternatively, the antagonist includes a fragment of an IL-21 receptor polypeptide, e.g., an IL-21 binding domain of an IL-21 receptor polypeptide. In one embodiment, the antagonist is a fusion protein comprising the aforesaid IL-21 or IL-21 receptor polypeptides or fragments thereof fused to a second moiety, e.g., a polypeptide (e.g., an immunoglobulin chain).

In yet another aspect, the invention features a method of modulating, e.g., reducing or inhibiting, or increasing, interleukin-12 (IL-12) activity or level in a cell, cell population, or a subject. The method includes:

(optionally) identifying a cell, e.g., a T cell, cell population or subject, where modulation of IL-12 is desired; and

contacting said cell or cell population with, or administering to said subject, an IL-21 modulator, e.g., an agonist or an antagonist of IL-21, in an amount sufficient to modulate IL-12 activity or level in said cell, cell population, or a subject.

In one embodiment, the activity or level of IL-12 is/are reduced by contacting said cell or cell population, or administering to said subject, an IL-21 agonist, e.g., an IL-21 agonist as described herein, in an amount sufficient to reduce the activity or levels of IL-12.

In other embodiments, the activity or level of IL-12 is/are increased by contacting said cell or cell population, or administering to said subject, an IL-21 antagonist, e.g., an IL-21 antagonist as described herein, in an amount sufficient to increase the activity or level of IL-12.

In yet another aspect, the invention features a method of modulating, e.g., reducing or inhibiting, or increasing, Stat, e.g., Stat 4, activity or level in a cell, cell population, or a subject. The method includes:

(optionally) identifying a cell, e.g., a T cell, cell population or subject, where modulation of Stat activity or level is desired; and

contacting said cell or cell population with, or administering to said subject, an IL-21 modulator, e.g., an agonist or an antagonist of IL-21, in an amount sufficient to modulate Stat activity or level in said cell, cell population, or a subject.

In one embodiment, the activity or level of Stat is reduced by contacting said cell or cell population, or administering to said subject, an IL-21 agonist, e.g., an IL-21 agonist as described herein, in an amount sufficient to reduce the activity or level of Stat, e.g., Stat protein or mRNA.

5 In other embodiments, the activity or level of Stat is increased by contacting said cell or cell population, or administering to said subject, an IL-21 antagonist, e.g., an IL-21 antagonist as described herein, in an amount sufficient to increase the activity or level of Stat, e.g., Stat protein or mRNA.

In yet another aspect, the invention features a method of decreasing, inhibiting, suppressing, ameliorating, or delaying an autoimmune response (e.g., a Th1-mediated
10 autoimmune response), in a subject. The method includes administering to a subject in need thereof an IL-21 agonist, e.g., an IL-21 agonist as described herein, in an amount sufficient to decrease, inhibit, suppress, ameliorate, or delay said autoimmune response in said subject.

In yet another aspect, the invention features a method of decreasing, inhibiting, suppressing, ameliorating, or delaying a Th2-associated response (e.g., an allergic or an asthmatic
15 response), in a subject. The method includes administering to a subject in need thereof an IL-21 antagonist, e.g., an IL-21 antagonist as described herein, in an amount sufficient to decrease, inhibit, suppress, ameliorate, or delay said Th2-associated response in said subject.

In another aspect, the invention features a method of selectively identifying a Th2 cell in a cell population, e.g., a Th cell population, the method comprising determining the levels of IL-
20 21 nucleic acid (e.g., an IL-21 gene product) or polypeptide in a test sample, e.g., a Th cell, and a reference sample, e.g., a Th1 cell; and comparing the levels of said IL-21 nucleic acid in said test sample to levels of said IL-21 nucleic acid in the reference sample, e.g., the Th1 cell, wherein an increase in levels of said IL-21 nucleic acid in said test sample relative to said reference sample indicates the test sample is a Th2 cell.

25 As used herein, a "Th1-associated disorder" is a disease or condition associated with aberrant, e.g., increased or decreased, Th1 cell activity (e.g., increased or decreased Th1 cell responses) or number compared to a reference, e.g., a normal control. Examples of Th1-

13

associated disorders include, e.g., autoimmune disorders (e.g., multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, type I diabetes, Crohn's disease, psoriasis and myasthenia gravis, among others).

As used herein, a "Th2-associated disorder" is a disease or condition associated with aberrant, e.g., increased or decreased, Th2 cell activity (e.g., increased or decreased Th2 cell responses) or number compared to a reference, e.g., a normal control. Examples of Th2 disorders include, e.g., asthma, allergy, and disorders associated with antibody components (e.g., rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and lupus).

The IL-21 polypeptide used in the methods described herein can include the amino acid sequence of, e.g., a mammalian IL-21 polypeptide (such as a rodent, human, or non-human primate). For example, the IL-21 polypeptide can include the amino acid sequence of a human IL-21 polypeptide. A suitable amino acid sequence is the amino acid sequence of the IL-21 polypeptide shown in SEQ ID NO:2 (below).

IL-21 and IL-21 receptor polypeptides, including nucleotide and amino acid sequences, have been described in, e.g., US Patent No. 6, 057, 128, Parrish-Novak et al., Nature 408:57-63, 2000; Voashenrich et al., Curr. Biol. 11:R157-77, 2001, Asao et al., J. Immunol. 167:1-5, 2001; and Ozaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:11439-44, 2000. Amino acid sequences of IL-21 polypeptides are publicly known. For example, the nucleotide sequence and amino acid sequence of a human IL-21 is available at Genbank Acc. No. X_011082. The human IL-21 nucleotide sequence disclosed in this entry is presented below:

```

20      1 gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtacttatga gatccagtcc
      61 tggcaacatg gagaggattg tcatctgtct gatggtcac ttcttgggga cactgggtcca
     121 caaatcaagc tcccaaggtc aagatcgcca catgattaga atgcgtcaac ttatagatat
     181 tgttgatcag ctgaaaaatt atgtgaatga cttggtccct gaatttctgc cagctccaga
     241 agatgtagag acaaactgtg agtggtcagc ttttctctgc tttcagaagg cccaactaaa
25    301 gtcagcaaat acaggaaca atgaaaggat aatcaatgta tcaattaaaa agctgaagag
     361 gaaaccacct tccacaaatg cagggagaag acagaaacac agactaacat gcccttcatg
     421 tgattcttat gagaaaaaac caccacaaga attcctagaa agattcaaat cacttctcca
     481 aaagatgatt catcagcatc tgcctctag aacacacgga agtgaagatt cctgaggatc
     541 taacttgcag ttggacacta tgttacatac tctaataatag tagtgaaagt catttctttg
30    601 tattccaagt ggaggag (SEQ ID NO:1)

```

The amino acid sequence encoded by the disclosed human IL-21 nucleic acid sequence is presented below:

MRSSPGNMERIVICLMVIFLGTLVHKSSSQGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEF
 LPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRL
 TCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO:2).

5 The nucleotide sequence of a human IL-21 receptor nucleic acid is provided below:

1 gaagcagcag gtacccctc cacatcccta gggctctgtg atgtaggcag aggcccggtg
 61 gagtcagcat gccgcgtggc tgggcgccc ccttgctcct gctgctgctc cagggagggt
 121 ggggctgccc cgacctcgtc tgctacaccg attacctcca gacggtcacg tgcacctctg
 10 181 aaatgtggaa cctccacccc agcacgctca cccttacctg gcaagaccag tatgaagagc
 241 tgaaggacga ggccacctcc tgcagcctcc acaggtcggc ccacaatgcc acgcattgcca
 301 cctacacctg ccacatggat gtattccact tcatggcoga cgacattttc agtgtcaaca
 361 tcacagacca gtctggcaac tactcccagg agtgtggcag ctttctcctg gctgagagca
 421 tcaagccggc tcccccttc aacgtgactg tgaccttctc aggacagtat aatatctcct
 15 481 ggcgctcaga ttacgaagac cctgccttct acatgctgaa gggcaagctt cagtatgagc
 541 tgcagtacag gaaccgggga gacccttggg ctgtgagtcc gaggagaaag ctgatctcag
 601 tggactcaag aagtgtctcc ctctccccc tggagttccg caaagactcg agctatgagc
 661 tgcaggtgcy ggcaggggccc atgcctggct cctcctacca ggggacctgg agtgaatgga
 721 gtgacctggg catctttcag acccagtcag aggagttaaa ggaaggctgg aacctcacc
 20 781 tgetgcttct cctcctgctt gtcatagtct tcattcctgc cttctggagc ctgaagacc
 841 atccattgtg gaggctatgg aagaagatat gggccgtccc cagccctgag cggttcttca
 901 tgccctgta caagggtgc agcggagact tcaagaaatg ggtgggtgca cccttactg
 961 gctccagcct ggagctggga cctggagcc cagaggtgcc ctccacctg gagggtgaca
 1021 gctgccacce accacggagc ccggccaaga ggtgcagct caccggagcta caagaaccag
 25 1081 cagagctggg ggagctctgac ggtgtgccc agcccgctt ctggccgaca gcccagaact
 1141 cggggggctc agcttacagt gaggagaggg atcggccata cggcctgggtg tccattgaca
 1201 cagtgactgt gctagatgca gaggggccat gcacctggcc ctgcagctgt gaggatgagc
 1261 gctaccacgc cctggacctg gatgtggcc tggagcccag cccaggccta gaggacccac
 1321 tcttggtatg agggaccaca gtctgtcct gtggtgtgtg ctgagctggc agccttggg
 30 1381 taggagggcc cctgggaagc ctctgggaca gactaaagcc accccttgca gatggggagg
 1441 actgggctgg gggactgccc tggggtggcc ggtcacctgg aggggtctca gagagtgagg
 1501 cgggctcacc cctggccggc ctggatatgg acacgtttga cagtggcttt gtgggtctg
 1561 actgcagcag ccctgtggag tgtgacttca ccagccccgg ggacgaagga ccccccgga
 1621 gctacctccg ccagtgggtg gtcattectc cggcactttc gagccctgga cccaggcca
 35 1681 gctaatgagg ctgactggat gtccagagct ggccaggcca ctgggacctg agccagagac
 1741 aaggtcacct gggctgtgat gtgaagacac ctgcagcctt tgggtctcctg gatgggcctt
 1801 tgagcctgat gtttacagtg tctgtgtgtg tgtgtgcata tgtgtgtgtg tgcatatgca
 1861 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtc tttaggtgcg agtggcatgt ccacgtgtgt gtgtgattgc
 1921 acgtgcctgt gggcctggga taatgcccat ggtactccat gcattcacct gccctgtgca
 40 1981 tgtctggact cacggagctc acccatgtgc acaagtgtgc acagtaaacg tgtttgtggt
 2041 caacagatga caacagccgt cctccctcct agggctctgt gttgcaagtt ggtccacagc
 2101 atctccgggg ctttgtggga tcagggcatt gcctgtgact gaggcggagc ccagccctcc
 2161 agcgtctgcc tccaggagct gcaagaagtc catattgttc cttatcacct gccaacagga
 2221 agcgaaggg gatggagtga gcccatgggtg acctcgggaa tggcaatttt ttgggcggcc
 45 2281 cctggacgaa ggtctgaatc ccgactctga taccttctgg ctgtgctacc tgagccaagt
 2341 cgcctccct ctctgggcta gagtctcctt atccagacag tggggaaggc atgacacacc
 2401 tgggggaat tggcgatgtc acccgtgtac ggtacgcagc ccagagcaga cctcaataa
 2461 acgtcagctt ctttcttct gcggccagag ccgaggcggg cgggggtgag aacatcaatc
 2521 gtcagcgaca gcctgggcac ccgcggggccc gtcccgcctg cagagggcca ctcgggggg
 50 2581 tttccaggct taaaatcagt ccgttctgtc tcttggaaac agctccccac caaccaagat
 2641 ttctttttct aacttctgct actaagtttt taaaaattcc ctttatgcac ccaagagata
 2701 tttattaaac accaattacg tagcaggcca tggctcatgg gaccacccc ccgtggcact

2761 catggagggg gctgcaggtt ggaactatgc agtgtgctcc ggccacacat. cctgctgggc
2821 cccctaccct gccccaattc aatcctgccs ataatcctg tcttatttgc tcatcctgga
2881 gaattga (SEQ ID NO:3)

5

The disclosed IL-21 receptor nucleic acid sequence encodes a polypeptide with the following amino acid sequence:

10 MPRGNAAPLLLLLLQGGNGCPDLVCYTDYLQTVICILEMNNLHPSTLTLTWQDQYEELKDEATSCSLHRSAHNATHAT
YTCHMDVHFHMAADDIFSVNITDQSGNYSQECGSFLLAESIKPAPPFNVTVTFSGQYNISWRSDYEDPAFYMLKSKLQY
ELQYRNRGDPMAVSPRRKLISVDSRSVSLPLEFRKIDSSYELQVRAGPMGSSYQGTWSEWSDPFIPTQSEELKEGW
NPHLLLLLLLLLVIVFIPAFWSLKTHTPLWRLNKKIWA VPSPERFFMPLYKGCSDGDFKKNVGAPFTGSSLELGPWSPFVPS
TLEVYSCHPPRSPAKRLQLTELQEPALVESDGVPKPSFWPTAQNSGGSAYSEERDRPYGLVSI DTVTVLDAEGPCTW
PCSCEDDGYPALDLDAGLEPSPGLEDFLLDAGTTVLSCGCVSAGSPGLGGPLGSLLDRLKPFLADGEDWAGGLPWGGR
15 SPGGVSESEAGSPLAGLDMDTFDSGFVGSDCSSPVECDFTSPGDEGPFRSYLRQWVVI PPPLSSPGPQAS (SEQ ID
NO:4)

The nucleic acid sequence homology may be determined as the degree of identity between two nucleotide or amino acid sequences. The homology may be determined using computer programs known in the art, such as GAP software provided in the GCG program package. See, *Needleman and Wunsch 1970 J Mol Biol 48: 443-453*. Using GCG GAP software with the
20 following settings for nucleic acid sequence comparison: GAP creation penalty of 5.0 and GAP extension penalty of 0.3, the coding region of the analogous nucleic acid sequences referred to above exhibits a degree of identity preferably of at least 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, or 99%, with the CDS (encoding) part of the DNA sequence shown in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3. Similarly the amino acid sequences referred to herein exhibit a degree of identity
25 preferably of at least 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, or 99%, with the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5 or SEQ ID NO:6.

The term "sequence identity" refers to the degree to which two polynucleotide or polypeptide sequences are identical on a residue-by-residue basis over a particular region of comparison. The term "percentage of sequence identity" is calculated by comparing two
30 optimally aligned sequences over that region of comparison, determining the number of positions at which the identical nucleic acid base (e.g., A, T, C, G, U, or I, in the case of nucleic acids) occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of

matched positions by the total number of positions in the region of comparison (*i.e.*, the window size), and multiplying the result by 100 to yield the percentage of sequence identity. The term "substantial identity" as used herein denotes a characteristic of a polynucleotide sequence, wherein the polynucleotide comprises a sequence that has at least 80 percent sequence identity, preferably at least 85 percent identity and often 90 to 95 percent sequence identity, more usually at least 98 or 99 percent sequence identity as compared to a reference sequence over a comparison region. The term "percentage of positive residues" is calculated by comparing two optimally aligned sequences over that region of comparison, determining the number of positions at which the identical and conservative amino acid substitutions, as defined above, occur in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the region of comparison (*i.e.*, the window size), and multiplying the result by 100 to yield the percentage of positive residues.

Agents that increase IL-21 or IL-21 receptor levels in a cell or cell population can additionally include IL-21 agonists or IL-21 receptor agonists. Such agonists can be identified by identifying test compounds that exert one or more of the activities IL-21 exerts on T helper cell populations.

The subject can be a mammal, *e.g.*, a human, a non-human primate, a dog, cat, cow, horse, pig or a rodent (including a rat or mouse). Any desired route of administration of IL-21 can be used. Suitable routes include intravenous (both bolus and infusion), intraperitoneal, subcutaneous or intramuscular form, all using forms well known to those of ordinary skill in the pharmaceutical arts. Injectables can be prepared in conventional forms, either as liquid solutions or suspensions.

Parenteral injectable administration is generally used for subcutaneous, intramuscular or intravenous injections and infusions.

IL-21 Antagonists

To inhibit an IL-21 mediated T helper cell effect, an agent that blocks or otherwise inhibits the interaction of IL-21 to an IL-21 receptor can be added to a T cell or a population of T

15

cells, e.g., T helper cells. For convenience, these inhibitors are referred to herein as "IL-21 antagonists." Examples of IL-21 antagonists include, e.g., soluble fragments of IL-21 or IL-21 receptors, fusion proteins containing these fragments, and antibodies to these fragments. IL-21 antagonists are useful for blocking IL-21 in Th2 mediated disease, including antibody-mediated disease. These diseases include asthma, allergy, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, and lupus.

IL-21 and IL-21 Receptor Fusion Proteins

IL-21, or IL-21 receptor, or active fragments of these proteins, can be fused to carrier molecules such as immunoglobulins for use in the herein described methods. For example, soluble forms of the IL-21 receptor may be fused through "linker" sequences to the Fc portion of an immunoglobulin or to the Fc portion of the immunoglobulin. Other fusion proteins, such as those with GST (*i.e.*, glutathione S-transferase), LexA, or MBP (*i.e.*, maltose binding protein), may also be used.

In a further embodiment, IL-21 or IL-21 receptor fusion protein may be linked to one or more additional moieties. For example, the IL-21 or IL-21 receptor fusion protein may additionally be linked to a GST fusion protein in which the IL-21 receptor fusion protein sequences are fused to the C-terminus of the GST sequences. Such fusion proteins can facilitate the purification of the IL-21 or IL-21 receptor fusion protein.

In another embodiment, the fusion protein includes a heterologous signal sequence (*i.e.*, a polypeptide sequence that is not present in a polypeptide naturally encoded by an IL-21 or IL-21 receptor nucleic acid) at its N-terminus. For example, the native IL-21 or IL-21 receptor signal sequence can be removed and replaced with a signal sequence from another protein.

A chimeric or fusion protein of the invention can be produced by standard recombinant DNA techniques. For example, DNA fragments coding for the different polypeptide sequences are ligated together in-frame in accordance with conventional techniques, e.g., by employing blunt-ended or stagger-ended termini for ligation, restriction enzyme digestion to provide for appropriate termini, filling-in of cohesive ends as appropriate, alkaline phosphatase treatment to avoid undesirable joining, and enzymatic ligation. In another embodiment, the fusion gene can

be synthesized by conventional techniques including automated DNA synthesizers.

Alternatively, PCR amplification of gene fragments can be carried out using anchor primers that give rise to complementary overhangs between two consecutive gene fragments that can subsequently be annealed and reamplified to generate a chimeric gene sequence (see, for example, Ausubel *et al.* (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Moreover, many expression vectors are commercially available that encode a fusion moiety (e.g., an Fc region of an immunoglobulin heavy chain). An IL-21 or IL-21 receptor encoding nucleic acid can be cloned into such an expression vector such that the fusion moiety is linked in-frame to the immunoglobulin protein.

In some embodiments, the IL-21 or IL-21 receptor polypeptide moiety is provided as a variant IL-21 receptor polypeptide having a mutation in the naturally-occurring IL-21 or IL-21 receptor sequence (wild type) that results in higher affinity (relative to the non-mutated sequence) binding of the altered IL-21 for an IL-21 receptor, or higher affinity (relative to the non-mutated sequence) of the altered IL-21 receptor polypeptide for IL-21.

In some embodiments, the IL-21 polypeptide or IL-21 receptor polypeptide moiety is provided as a variant IL-21 or IL-21 receptor polypeptide having mutations in the naturally-occurring IL-21 or IL-21 receptor sequence (wild type) that results in an IL-21 or IL-21 receptor sequence more resistant to proteolysis (relative to the non-mutated sequence).

A signal peptide that can be included in the fusion protein is MPLLLLLLLLLPSPLHP (SEQ ID NO:5). If desired, one or more amino acids can additionally be inserted between the first polypeptide moiety comprising the IL-21 or IL-21 receptor moiety and the second polypeptide moiety.

The second polypeptide is preferably soluble. In some embodiments, the second polypeptide enhances the half-life, (e.g., the serum half-life) of the linked polypeptide. In some embodiments, the second polypeptide includes a sequence that facilitates association of the fusion polypeptide with a second IL-21 receptor polypeptide. In preferred embodiments, the second polypeptide includes at least a region of an immunoglobulin polypeptide.

16

Immunoglobulin fusion polypeptides are known in the art and are described in e.g., US Patent Nos. 5,516,964; 5,225,538; 5,428,130; 5,514,582; 5,714,147; and 5,455,165.

In some embodiments, the second polypeptide comprises a full-length immunoglobulin polypeptide. Alternatively, the second polypeptide comprise less than full-length

5 immunoglobulin polypeptide, e.g., a heavy chain, light chain, Fab, Fab₂, Fv, or Fc. Preferably, the second polypeptide includes the heavy chain of an immunoglobulin polypeptide. More preferably, the second polypeptide includes the Fc region of an immunoglobulin polypeptide.

In some embodiments, the second polypeptide has less effector function than the effector function of a Fc region of a wild-type immunoglobulin heavy chain. Fc effector function
10 includes for example, Fc receptor binding, complement fixation and T cell depleting activity. (see for example, US Patent No. 6,136,310) Methods of assaying T cell depleting activity, Fc effector function, and antibody stability are known in the art. In one embodiment the second polypeptide has low or no affinity for the Fc receptor. In an alternative embodiment, the second polypeptide has low or no affinity for complement protein C1q.

15 A preferred second polypeptide sequence includes the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6. This sequence includes a Fc region. Underlined amino acids are those that differ from the amino acid found in the corresponding position of the wild-type immunoglobulin sequence:
HTCPPCPAPEALGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVS¹SVLT²VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVP³IEKTI⁴SKAKGQPREPQVYTLPP
20 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT⁵PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFS⁶CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 6)

IL-21 and IL-21 Receptor Antibodies

The term "antibody" as used herein refers to immunoglobulin molecules and
25 immunologically active portions of immunoglobulin (Ig) molecules, i.e., molecules that contain an antigen binding site that specifically binds (immunoreacts with) an antigen. Such antibodies include, e.g., polyclonal, monoclonal, chimeric, single chain, F_{ab}, F_{ab}¹ and F_{(ab)₂} fragments, and an F_{ab} expression library. In general, an antibody molecule obtained from humans relates to any of the classes IgG, IgM, IgA, IgE and IgD, which differ from one another by the nature of the
30 heavy chain present in the molecule. Certain classes have subclasses as well, such as IgG₁, IgG₂,

and others. Furthermore, in humans, the light chain may be a kappa chain or a lambda chain. Reference herein to antibodies includes a reference to all such classes, subclasses and types of human antibody species. Antibodies to IL-21 or IL-21 receptor polypeptides also include antibodies to fusion proteins containing IL-21 or IL-21 receptor polypeptides or fragments of IL-21 or IL-21 receptor polypeptides.

An IL-21 polypeptide or IL-21 receptor polypeptide can be used as an antigen, or a portion or fragment thereof, and additionally can be used as an immunogen to generate antibodies that immunospecifically bind the antigen, using standard techniques for polyclonal and monoclonal antibody preparation. Antigenic peptide fragments of the antigen for use as immunogens include, e.g., at least 7 amino acid residues of the amino acid sequence of the amino terminal region, such as an amino acid sequence shown in SEQ ID NOs:1 or 3, and encompass an epitope thereof such that an antibody raised against the peptide forms a specific immune complex with the full length protein or with any fragment that contains the epitope. Preferably, the antigenic peptide comprises at least 10 amino acid residues, or at least 15 amino acid residues, or at least 20 amino acid residues, or at least 30 amino acid residues. Preferred epitopes encompassed by the antigenic peptide are regions of the protein that are located on its surface; commonly these are hydrophilic regions.

In some embodiments, at least one epitope encompassed by the antigenic peptide is a region of IL-21 or IL-21 receptor polypeptide that is located on the surface of the protein, e.g., a hydrophilic region. A hydrophobicity analysis of a IL-21 or IL-21 receptor polypeptide will indicate which regions of an IL-21 or IL-21 receptor protein are particularly hydrophilic and, therefore, are likely to encode surface residues useful for targeting antibody production. As a means for targeting antibody production, hydropathy plots showing regions of hydrophilicity and hydrophobicity may be generated by any method well known in the art, including, for example, the Kyte Doolittle or the Hopp Woods methods, either with or without Fourier transformation. See, e.g., Hopp and Woods (1981) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78: 3824-3828; Kyte and Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-142. Antibodies that are specific for one or more domains within an antigenic protein, or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof, are also provided

herein.

A protein of the invention, or a derivative, fragment, analog, homolog or ortholog thereof, may be utilized as an immunogen in the generation of antibodies that immunospecifically bind these protein components.

5 Various procedures known within the art may be used for the production of polyclonal or monoclonal antibodies directed against a protein of the invention, or against derivatives, fragments, analogs homologs or orthologs thereof. See, for example, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Harlow and Lane (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Some of these antibodies are discussed below.

Polyclonal Antibodies

10 For the production of polyclonal antibodies, various suitable host animals (e.g., rabbit, goat, mouse or other mammal) may be immunized by one or more injections with the native protein, a synthetic variant thereof, or a derivative of the foregoing. An appropriate immunogenic preparation can contain, for example, the naturally occurring immunogenic protein, a chemically synthesized polypeptide representing the immunogenic protein, or a recombinantly expressed immunogenic protein. Furthermore, the protein may be conjugated to a second protein known to be immunogenic in the mammal being immunized. Examples of such immunogenic proteins include but are not limited to keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, 15 bovine thyroglobulin, and soybean trypsin inhibitor.

20 The preparation can further include an adjuvant. Various adjuvants used to increase the immunological response include, but are not limited to, Freund's (complete and incomplete), mineral gels (e.g., aluminum hydroxide), surface active substances (e.g., lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, dinitrophenol, etc.), adjuvants usable in humans such as Bacille Calmette-Guerin and Corynebacterium parvum, or similar immunostimulatory agents. Additional examples of adjuvants which can be employed include MPL-TDM adjuvant (monophosphoryl Lipid A, synthetic trehalose dicorynomycolate).

The polyclonal antibody molecules directed against the immunogenic protein can be

isolated from the mammal (e.g., from the blood) and further purified by well known techniques, such as affinity chromatography using protein A or protein G, which provide primarily the IgG fraction of immune serum. Subsequently, or alternatively, the specific antigen which is the target of the immunoglobulin sought, or an epitope thereof, may be immobilized on a column to purify the immune specific antibody by immunoaffinity chromatography. Purification of immunoglobulins is discussed, for example, by Wilkinson. Wilkinson (2000) *The Scientist*, 14: 25-28.

Monoclonal Antibodies

The term "monoclonal antibody" (MAb) or "monoclonal antibody composition", as used herein, refers to a population of antibody molecules that contain only one molecular species of antibody molecule consisting of a unique light chain gene product and a unique heavy chain gene product. In particular, the complementarity determining regions (CDRs) of the monoclonal antibody are identical in all the molecules of the population. MABs thus contain an antigen binding site capable of immunoreacting with a particular epitope of the antigen characterized by a unique binding affinity for it.

Monoclonal antibodies can be prepared using hybridoma methods, such as those described by Kohler and Milstein (1975) *Nature*, 256:495. In a hybridoma method, a mouse, hamster, or other appropriate host animal, is typically immunized with an immunizing agent to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the immunizing agent. Alternatively, the lymphocytes can be immunized *in vitro*.

The immunizing agent will typically include the protein antigen, a fragment thereof or a fusion protein thereof. Generally, either peripheral blood lymphocytes are used if cells of human origin are desired, or spleen cells or lymph node cells are used if non-human mammalian sources are desired. The lymphocytes are then fused with an immortalized cell line using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell. Goding, *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE*, Academic Press, (1986) pp. 59-103. Immortalized cell lines are usually transformed mammalian cells, particularly myeloma cells of rodent, bovine and

18

human origin. Usually, rat or mouse myeloma cell lines are employed. The hybridoma cells can be cultured in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, immortalized cells. For example, if the parenteral cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine ("HAT medium"), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred immortalized cell lines are those that fuse efficiently, support stable high level expression of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. More preferred immortalized cell lines are murine myeloma lines, which can be obtained, for instance, from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California and the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (Kozbor (1984) J. Immunol., 133:3001; Brodeur *et al.*, MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION TECHNIQUES AND APPLICATIONS, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63).

The culture medium in which the hybridoma cells are cultured can then be assayed for the presence of monoclonal antibodies directed against the antigen. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by the hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Such techniques and assays are known in the art. The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis of Munson and Pollard (1980) Anal. Biochem., 107:220. Preferably, antibodies having a high degree of specificity and a high binding affinity for the target antigen are isolated.

After the desired hybridoma cells are identified, the clones can be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods. Suitable culture media for this purpose include, for example, Dulbecco's Modified Eagle's Medium and RPMI-1640 medium. Alternatively, the hybridoma cells can be grown *in vivo* as ascites in a mammal.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones can be isolated or purified from the culture medium or ascites fluid by conventional immunoglobulin purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxyapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

5 The monoclonal antibodies can also be made by recombinant DNA methods, such as those described in U.S. Patent No. 4,816,567. DNA encoding the monoclonal antibodies of the invention can be readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells of the invention serve as a preferred
10 source of such DNA. Once isolated, the DNA can be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. The DNA also can be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains
15 in place of the homologous murine sequences (U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison (1994) Nature 368, 812-13) or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide. Such a non-immunoglobulin polypeptide can be substituted for the constant domains of an antibody of the invention, or can be substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody of the
20 invention to create a chimeric bivalent antibody.

Humanized Antibodies

The antibodies directed against the protein antigens of the invention can further comprise humanized antibodies or human antibodies. These antibodies are suitable for administration to
25 humans without engendering an immune response by the human against the administered immunoglobulin. Humanized forms of antibodies are chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ or other antigen-binding subsequences of antibodies) that are principally comprised of the sequence of a human

19

immunoglobulin, and contain minimal sequence derived from a non-human immunoglobulin. Humanization can be performed following the method of Winter and co-workers (Jones *et al.* (1986) *Nature*, 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) *Nature*, 332:323-327; Verhoeven *et al.* (1988) *Science*, 239:1534-1536), by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody. (See also U.S. Patent No. 5,225,539.) In some instances, Fv framework residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Humanized antibodies can also comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or framework sequences. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the framework regions are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin (Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988; and Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596).

Human Antibodies

Fully human antibodies relate to antibody molecules in which essentially the entire sequences of both the light chain and the heavy chain, including the CDRs, arise from human genes. Such antibodies are termed "human antibodies", or "fully human antibodies" herein. Human monoclonal antibodies can be prepared by the trioma technique; the human B-cell hybridoma technique (see Kozbor, *et al.* (1983) *Immunol Today* 4: 72) and the EBV hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (see Cole, *et al.*, 1985 In: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Human monoclonal antibodies may be utilized in the practice of the invention and may be produced by using human hybridomas (see Cote, *et al.* (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2026-2030) or by transforming human B-cells with Epstein Barr Virus *in vitro* (see Cole, *et al.* (1985) In: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

In addition, human antibodies can also be produced using additional techniques, including phage display libraries. See Hoogenboom and Winter (1991) *J. Mol. Biol.*, 227:381; Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222:581. Similarly, human antibodies can be made by introducing human immunoglobulin loci into transgenic animals, *e.g.*, mice in which the endogenous immunoglobulin genes have been partially or completely inactivated. Upon challenge, human antibody production is observed, which closely resembles that seen in humans in all respects, including gene rearrangement, assembly, and antibody repertoire. This approach is described, for example, in U.S. Patent Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, and in Marks *et al.* (*Bio/Technology* 10, 779-783 (1992)); Lonberg *et al.* (*Nature* 368 856-859 (1994)); Morrison (*Nature* 368, 812-13 (1994)); Fishwild *et al.*, (*Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996)); Neuberger (*Nature Biotechnology* 14, 826 (1996)); and Lonberg and Huszar (*Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995)).

Human antibodies may additionally be produced using transgenic nonhuman animals which are modified so as to produce fully human antibodies rather than the animal's endogenous antibodies in response to challenge by an antigen. See PCT publication WO94/02602. The endogenous genes encoding the heavy and light immunoglobulin chains in the nonhuman host have been incapacitated, and active loci encoding human heavy and light chain immunoglobulins are inserted into the host's genome. The human genes are incorporated, for example, using yeast artificial chromosomes containing the requisite human DNA segments. An animal which provides all the desired modifications is then obtained as progeny by crossbreeding intermediate transgenic animals containing fewer than the full complement of the modifications. The preferred embodiment of such a nonhuman animal is a mouse, and is termed the XenomouseTM as disclosed in PCT publications WO 96/33735 and WO 96/34096. This animal produces B cells which secrete fully human immunoglobulins. The antibodies can be obtained directly from the animal after immunization with an immunogen of interest, as, for example, a preparation of a polyclonal antibody, or alternatively from immortalized B cells derived from the animal, such as hybridomas producing monoclonal antibodies. Additionally, the genes encoding the immunoglobulins with human variable regions can be recovered and expressed to obtain the

20

antibodies directly, or can be further modified to obtain analogs of antibodies such as, for example, single chain Fv molecules.

An example of a method of producing a nonhuman host, exemplified as a mouse, lacking expression of an endogenous immunoglobulin heavy chain is disclosed in U.S. Patent No.

5 5,939,598. It can be obtained by a method including deleting the J segment genes from at least one endogenous heavy chain locus in an embryonic stem cell to prevent rearrangement of the locus and to prevent formation of a transcript of a rearranged immunoglobulin heavy chain locus, the deletion being effected by a targeting vector containing a gene encoding a selectable marker, and producing from the embryonic stem cell a transgenic mouse whose somatic and germ cells
10 contain the gene encoding the selectable marker.

A method for producing an antibody of interest, such as a human antibody, is disclosed in U.S. Patent No. 5,916,771. It includes introducing an expression vector that contains a nucleotide sequence encoding a heavy chain into one mammalian host cell in culture, introducing an expression vector containing a nucleotide sequence encoding a light chain into another
15 mammalian host cell, and fusing the two cells to form a hybrid cell. The hybrid cell expresses an antibody containing the heavy chain and the light chain.

In a further improvement on this procedure, a method for identifying a clinically relevant epitope on an immunogen, and a correlative method for selecting an antibody that binds immunospecifically to the relevant epitope with high affinity, are disclosed in PCT publication
20 WO 99/53049.

Fab Fragments and Single Chain Antibodies

According to the invention, techniques can be adapted for the production of single-chain antibodies specific to an antigenic protein of the invention (see *e.g.*, U.S. Patent No. 4,946,778).

25 In addition, methods can be adapted for the construction of Fab expression libraries (see *e.g.*, Huse, *et al.* (1989) *Science* 246: 1275-1281) to allow rapid and effective identification of monoclonal Fab fragments with the desired specificity for a protein or derivatives, fragments, analogs or homologs thereof. Antibody fragments that contain the idiotypes to a protein antigen

may be produced by techniques known in the art including, but not limited to: (i) an F(ab')₂ fragment produced by pepsin digestion of an antibody molecule; (ii) an Fab fragment generated by reducing the disulfide bridges of an F(ab')₂ fragment; (iii) an Fab fragment generated by the treatment of the antibody molecule with papain and a reducing agent and (iv) Fv fragments.

5

Bispecific Antibodies

Bispecific antibodies are monoclonal, preferably human or humanized, antibodies that have binding specificities for at least two different antigens. In the present case, one of the binding specificities is for an antigenic protein of the invention. The second binding target is any other antigen, and advantageously is a cell-surface protein or receptor or receptor subunit.

10

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditionally, the recombinant production of bispecific antibodies is based on the co-expression of two immunoglobulin heavy-chain/light-chain pairs, where the two heavy chains have different specificities. (Milstein and Cuello (1983) *Nature*, 305:537-539. Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of ten different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. The purification of the correct molecule is usually accomplished by affinity chromatography steps. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829, and in Traunecker *et al.* (1991) *EMBO J.*, 10:3655-3659.

15

20

Antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) can be fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy-chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light-chain binding present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy-chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh *et al.* (1986) *Methods in Enzymology*, 121:210.

25

29

21

According to another approach described in WO 96/27011, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the CH3 region of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (e.g. tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (e.g. alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

Bispecific antibodies can be prepared as full length antibodies or antibody fragments (e.g. F(ab')₂ bispecific antibodies). Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan *et al.* (1985) Science 229:81 describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate F(ab')₂ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

Additionally, Fab' fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby *et al.* (1992) J. Exp. Med. 175:217-225 describe the production of a fully humanized bispecific antibody F(ab')₂ molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the ErbB2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

Various techniques for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostelny *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148(5):1547-1553. The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (V_H) connected to a light-chain variable domain (V_L) by a linker which is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the V_H and V_L domains of one fragment are forced to pair with the complementary V_L and V_H domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported. See, Gruber *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:5368.

Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared. Tutt *et al.* (1991) *J. Immunol.* 147:60.

Exemplary bispecific antibodies can bind to two different epitopes, at least one of which originates in the protein antigen of the invention. Alternatively, an anti-antigenic arm of an immunoglobulin molecule can be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (e.g. CD2, CD3, CD28, or B7), or Fc receptors for IgG (Fc R), such as Fc RI (CD64), Fc RII (CD32) and Fc RIII (CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the cell expressing the particular antigen. Bispecific antibodies can also be used to direct cytotoxic agents to cells which express a particular antigen. These antibodies possess an antigen-binding arm and an arm which binds a cytotoxic agent or a radionuclide chelator, such as EOTUBE, DPTA, DOTA, or TETA. Another bispecific antibody of interest binds the protein antigen described herein and further binds tissue factor (TF).

22 2A

Pharmaceutical Compositions

The IL-21 modulators described herein can be conveniently provided in pharmaceutical compositions. The compositions are preferably suitable for internal use and include an effective amount of a pharmacologically active compound of the invention, alone or in combination, with one or more pharmaceutically acceptable carriers. The compounds are especially useful in that they have very low, if any toxicity.

In practice, the compounds or their pharmaceutically acceptable salts, are administered in amounts which will be sufficient to effect the desired change, i.e., an increase or decrease in IL-21 levels, and are used in the pharmaceutical form most suitable for such purposes.

For instance, for oral administration in the form of a tablet or capsule (e.g., a gelatin capsule), the active drug component can be combined with an oral, non-toxic pharmaceutically acceptable inert carrier such as ethanol, glycerol, water and the like. Moreover, when desired or necessary, suitable binders, lubricants, disintegrating agents and coloring agents can also be incorporated into the mixture. Suitable binders include starch, magnesium aluminum silicate, starch paste, gelatin, methylcellulose, sodium carboxymethylcellulose and/or polyvinylpyrrolidone, natural sugars such as glucose or beta-lactose, corn sweeteners, natural and synthetic gums such as acacia, tragacanth or sodium alginate, polyethylene glycol, waxes and the like. Lubricants used in these dosage forms include sodium oleate, sodium stearate, magnesium stearate, sodium benzoate, sodium acetate, sodium chloride, silica, talcum, stearic acid, its magnesium or calcium salt and/or polyethyleneglycol and the like. Disintegrators include, without limitation, starch, methyl cellulose, agar, bentonite, xanthan gum starches, agar, alginic acid or its sodium salt, or effervescent mixtures, and the like. Diluents, include, e.g., lactose, dextrose, sucrose, mannitol, sorbitol, cellulose and/or glycine.

Injectable compositions are preferably aqueous isotonic solutions or suspensions, and suppositories are advantageously prepared from fatty emulsions or suspensions. The compositions may be sterilized and/or contain adjuvants, such as preserving, stabilizing, wetting or emulsifying agents, solution promoters, salts for regulating the osmotic pressure and/or buffers. In addition, they may also contain other therapeutically valuable substances. The

compositions are prepared according to conventional mixing, granulating or coating methods, respectively, and contain about 0.1 to 75%, preferably about 1 to 50%, of the active ingredient.

The compounds of the invention can also be administered in such oral dosage forms as timed release and sustained release tablets or capsules, pills, powders, granules, elixers, tinctures, suspensions, syrups and emulsions.

Liquid, particularly injectable compositions can, for example, be prepared by dissolving, dispersing, etc. The active compound is dissolved in or mixed with a pharmaceutically pure solvent such as, for example, water, saline, aqueous dextrose, glycerol, ethanol, and the like, to thereby form the injectable solution or suspension. Additionally, solid forms suitable for dissolving in liquid prior to injection can be formulated. Injectable compositions are preferably aqueous isotonic solutions or suspensions. The compositions may be sterilized and/or contain adjuvants, such as preserving, stabilizing, wetting or emulsifying agents, solution promoters, salts for regulating the osmotic pressure and/or buffers. In addition, they may also contain other therapeutically valuable substances.

The compounds of the invention can be administered in intravenous (both bolus and infusion), intraperitoneal, subcutaneous or intramuscular form, all using forms well known to those of ordinary skill in the pharmaceutical arts. Injectables can be prepared in conventional forms, either as liquid solutions or suspensions.

Parenteral injectable administration is generally used for subcutaneous, intramuscular or intravenous injections and infusions. Additionally, one approach for parenteral administration employs the implantation of a slow-release or sustained-released systems, which assures that a constant level of dosage is maintained, according to U.S. Pat. No. 3,710,795, incorporated herein by reference.

Furthermore, preferred compounds for the invention can be administered in intranasal form via topical use of suitable intranasal vehicles, or via transdermal routes, using those forms of transdermal skin patches well known to those of ordinary skill in that art. To be administered in the form of a transdermal delivery system, the dosage administration will, of course, be continuous rather than intermittent throughout the dosage regimen. Other preferred topical

preparations include creams, ointments, lotions, aerosol sprays and gels, wherein the concentration of active ingredient would range from 0.1% to 15%, w/w or w/v.

For solid compositions, excipients include pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharin, talcum, cellulose, glucose, sucrose, magnesium carbonate, and the like may be used. The active compound defined above, may be also formulated as suppositories using for example, polyalkylene glycols, for example, propylene glycol, as the carrier. In some embodiments, suppositories are advantageously prepared from fatty emulsions or suspensions.

The compounds of the invention can also be administered in the form of liposome delivery systems, such as small unilamellar vesicles, large unilamellar vesicles and multilamellar vesicles. Liposomes can be formed from a variety of phospholipids, containing cholesterol, stearylamine or phosphatidylcholines. In some embodiments, a film of lipid components is hydrated with an aqueous solution of drug to a form lipid layer encapsulating the drug, as described in U.S. Pat. No. 5,262,564.

Compounds of the invention may also be delivered by the use of monoclonal antibodies as individual carriers to which the compound molecules are coupled. The compounds of the invention may also be coupled with soluble polymers as targetable drug carriers. Such polymers can include polyvinylpyrrolidone, pyran copolymer, polyhydroxypropyl-methacrylamide-phenol, polyhydroxyethylaspanamidephenol, or polyethyleneoxidepolylysine substituted with palmitoyl residues. Furthermore, the compounds of the invention may be coupled to a class of biodegradable polymers useful in achieving controlled release of a drug, for example, polylactic acid, polyeppilon caprolactone, polyhydroxy butyric acid, polyorthoesters, polyacetals, polydihydropyrans, polycyanoacrylates and cross-linked or amphipathic block copolymers of hydrogels.

The nucleic acid molecules of the invention can be inserted into vectors and used as gene therapy vectors. Gene therapy vectors can be delivered to a subject by, for example, intravenous injection, local administration (*see, e.g.*, U.S. Patent No. 5,328,470) or by stereotactic injection (*see, e.g.*, Chen, *et al.*, 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3054-3057). Pharmaceutical

preparation of the gene therapy vector can include the gene therapy vector in an acceptable diluent, or can comprise a slow release matrix in which the gene delivery vehicle is imbedded. Alternatively, where the complete gene delivery vector can be produced intact from recombinant cells, *e.g.*, retroviral vectors, the pharmaceutical preparation can include one or more cells that
5 produce the gene delivery system.

If desired, the pharmaceutical composition to be administered may also contain minor amounts of non-toxic auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH buffering agents, and other substances such as for example, sodium acetate, triethanolamine oleate, etc.

The dosage regimen utilizing the compounds is selected in accordance with a variety of
10 factors including type, species, age, weight, sex and medical condition of the patient; the severity of the condition to be treated; the route of administration; the renal and hepatic function of the patient; and the particular compound or salt thereof employed. An ordinarily skilled physician or veterinarian can readily determine and prescribe the effective amount of the drug required to prevent, counter or arrest the progress of the condition.

15 Oral dosages of the invention, when used for the indicated effects, will range between about 0.05 to 1000 mg/day orally. The compositions are preferably provided in the form of scored tablets containing 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100.0, 250.0, 500.0 and 1000.0 mg of active ingredient. Effective plasma levels of the compounds of the invention range from 0.002 mg to 50 mg per kg of body weight per day.

20 Compounds of the invention may be administered in a single daily dose, or the total daily dosage may be administered in divided doses of two, three or four times daily.

Any of the above pharmaceutical compositions may contain 0.1-99%, preferably 1-70% of the IL-21, IL-21 receptor, IL-21 agonist, or IL-21 antagonist.

If desired, the pharmaceutical compositions can be provided with an adjuvant. Adjuvants
25 are discussed above. In some embodiments, adjuvants can be used to increase the immunological response, depending on the host species, include Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin,

27

dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (bacille Calmette-Guerin) and *Corynebacterium parvum*. Generally, animals are injected with antigen using several injections in a series, preferably including at least three booster injections.

The invention will be further illustrated in the following non-limiting examples.

5 Examples 1-8 were performed using the following materials and methods.

EXAMPLES

Mice

Unless indicated otherwise, C57BL/6 mice of 6-8 weeks of age were used in all experiments. Stat6-deficient mice on C57BL/6-deficient background were generated as described in Kaplan, M.H., et al., Immunity 4: 313-9, 1996.

Lymphocyte preparation and culture

15 Lymphocytes were cultured in RPMI 1640 supplemented as described in (Kaplan, M.H., et al., Immunity 4: 313-9, 1996). Naïve Thp cells were purified from lymph node and spleens by cell sorting using anti-CD4 and anti-CD26L (Pharmingen; BD Life Sciences, San Diego, CA) to 95-98% purity.

20 Antibodies and cytokines

T-bet specific antiserum was prepared as described in (Szabo, S.J. et al., Cell 100: 655-69, 2000). Antibodies specific for Stat4, Stat1, and actin were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). An antibody specific for phosphorylated Stat4 was obtained from Zymed (South San Francisco, CA). The antibodies to anti-CD3, and-CD28, IL-4, and 25 IFN γ used in Th differentiation cultures were obtained from Pharmingen. Recombinant IL-4 was obtained from Preprotech. Recombinant IL-2 was provided by Chiron (Emeryville, CA). Recombinant IL-12 was provided by Hoffman-LaRoche (Nutley, NJ). Mouse IL-21 expressed in

COS supernatants was prepared and concentrated. One unit of activity was defined as the concentration of supernatant required to induce 50% maximal proliferation of BAF3 cells transfected with IL-21R. Mock transfected COS supernatant, prepared and concentrated in parallel with IL-21, was used as a control.

5

In vitro T helper cell differentiation

Naive T cells were plated onto anti-CD3, anti-CD28 (1 μ g/ml) coated plates at 1-2 X 10⁶/ml in the presence of 10 ng/ml IL-4, 10 μ g/ml anti-IFN γ (Th2 conditions) or 1 ng/ml IL-12, 10 μ g/ml anti IL-4 (Th1 conditions). Cells were expanded in IL-2 (100 U/ml) three days later.

10

After one week in culture, the cells were stimulated with PMA/Ionomycin, and cytokine production was determined by intracellular cytokine staining as described in (Bird, J.J. et al., *Immunity* 9: 229-37, 1998).

RNA Analysis

15

Total RNA was isolated using RNeasy (Qiagen; Valencia, CA). For northern analysis, the RNA was separated on a 1.5% agarose/6% formaldehyde gel and transferred to GeneScreen membrane (New England Nuclear). The membrane was hybridized with radiolabeled cDNA probes for IL-21, IL-4, IFN γ , γ -actin. For RealTime PCR, 1 μ g of RNA was primed with oligo (dT) and converted to cDNA using Superscript (Invitrogen Life Technologies; Carlsbad, CA). 25 ng of cDNA was used as template in PCR reactions using SYBR Green 2X or TaqMan 2X PCR mix (Applied Biosystems; Foster City, CA) and analyzed in the ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems) using the following primers:

20

IL-21 forward; 5'aagattcctgaggatccgagaag-3' (SEQ ID NO:7)

IL-21 reverse: 5'gcattcgtgagcgtctatagtgtc-3' (SEQ ID NO:8)

25

IL-21 TaqMan probe: 5'ttcccaggactgaggagacgcc-3' (SEQ ID NO:9)

IL-12R γ 2 forward: 5'tttccattttgcatcaagttctc3' (SEQ ID NO:10)

IL-12R γ 2 reverse: 5'ccgatctagagtcagccgct 3' (SEQ ID NO:11)

Stat4 forward: 5'aacctgagcccaacgacaa3' (SEQ ID NO:12)

Stat4 reverse: 5'agtgccggttgaccgctc3' (SEQ ID NO:13)

Primers and TaqMan probes for IL-4, IFN γ , and GAPDH have been published previously (Overbergh, L., et al., Cytokine 11: 305-12 1999).

5 Immunoblot analysis

Whole cell extracts were prepared by lysing cells in 50 mM Tris, 0.5% NP40, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl and clearing the lysates by centrifugation. Protein extracts were separated on an 8-10% polyacrylamide gel and transferred to an Optitrans membrane (Schleicher and Schuell; Keene, NH). The immunoblots were blocked for one hour at room temperature in 5% milk in TBST (50 mM Tris Ph 7.5, 100mM NaCl, 0.03% Tween 20) and incubated with the indicated antibody overnight at 4 degrees Centigrade. The blots were washed with TBST and incubated with anti-rabbit HRP-conjugated antibody (Zymed) at room temperature. After washing the blots with TBST, detection was performed using enhanced chemiluminescence (Amersham; Piscataway, NJ) according to the manufacturer's instructions.

15

Example 1. IL-21 is preferentially expressed in Th cells induced to develop along Th2 pathway *in vitro*.

Expression of IL-21 in Th subsets was determined. Northern analysis was performed on mRNA from naïve Thp (Th precursor) cells differentiated into Th1 or Th2 cells for one week and restimulated for four hours to induce cytokine production. The results are shown in FIGS. 1A-1D. For the results shown in FIG. 1A, Thp cells were cultured under Th1 and Th2 skewing conditions for 6 days. The cells were left resting (-) or restimulated with PMA/Ionomycin (P+I) for 4 hours. RNA was purified and assessed for cytokine expression by Northern blot. The results shown are representative of three independent experiments. Message encoding IL-21 was detected only in stimulated Th2 cells, and in contrast IL-21 message was undetectable in Th1 cultures. These results indicate that IL-21 is a Th2-specific cytokine.

20

25

To determine whether the potential to express IL-21 increases as cells develop along a Th2 pathway, IL-21 expression in primary stimulated Thp cells was compared to IL-21 message

expression in secondary stimulated Th2 cells. The results are shown in FIG. 1B. For the results shown, Thp cells were cultured under neutral, Th1 and Th2 skewing conditions. RNA was purified 24 hours after primary and secondary anti-CD3 stimulation. Cytokine expression was assessed in duplicate by RealTime PCR and shown relative to GAPDH. IL-21 message, like IL-4, was observed to be relatively low in Thp cells after primary stimulation. In contrast, IL-21 expression was markedly increased after cells were allowed to differentiate along the Th2 pathway. These results demonstrate that IL-21 gene expression is regulated similarly to other Th2-specific cytokines.

The effect of cytokine milieu on IL-21 expression in differentiated cells was determined. Th1 and Th2 cells were cultured in the presence of IL-4 and IFN γ , respectively, before secondary stimulation. Cells were responsive to these cytokines as evidenced by the activation of Stat6 and Stat1 by IL-4 and IFN γ .

The ability of IL-4 to restore IL-21 expression was examined. The results are shown in FIG. 1C. Thp cells were cultured under Th1 and Th2 skewing conditions for 5 days. IL-4 or IFN γ were added to indicated cultures 24 hours prior to secondary stimulation with anti-CD3. RNA was purified 24 hours after secondary stimulation and IL-21 expression was assessed in duplicate relative to GAPDH by RealTime PCR. Addition of IL-4 to Th1 cells was not able to restore IL-21 expression to the level seen in Th2 cells. Moreover, the addition of IFN γ to the Th2 cultures had no inhibitory effect on the expression of IL-21. These results demonstrate that expression of IL-21 in Th2 cells appears to be fixed early in Th2 differentiation and is not modulated directly by IL-4 or IFN γ .

Example 2. Th2 cells express IL-21 during a Th2 immune response in vivo.

The expression of IL-21 in Th2 cells during an in vivo immune response was determined in a pathogenic protozoan model system. Infection with the protozoan *Leishmania major* provides a well-characterized model for studying the in vivo response of Th cells (Reiner, S.L., et al., Annu Rev Immunol 13: 151-77, 1995). Some inbred mouse strains, such as C57BL/6, infected with *L. major* mount a protective and effective Th1 response against the pathogen.

26

Conversely, other inbred mouse strains, such as BALB mouse strains, develop primarily a Th2 response and fail to clear the infection.

Both C57BL/6 and BALB/c mice were infected with *L. major*. Cohorts of 8 BALB/c and C57BL/6 mice were infected with *L. major* in hind footpads. After 6 weeks CD4+ T cells from draining lymph nodes were purified and stimulated with anti-CD3. RNA was purified 6 hours after stimulation and cytokine expression was assessed relative to GAPDH by RealTime PCR.

The results are shown in FIG. 1D. As expected, CD4+ cells from C57BL/6 infected mice expressed more IFN γ than cells from BALB/c infected mice. Consistent with a predominantly Th2 response, CD4+ T cells from infected BALB/c mice made significantly more IL-4 than T cells from C57BL/6 mice. Similar to what was observed under in vitro Th2 skewing conditions, IL-21 was also preferentially expressed during an in vivo Th2 response in BALB/c mice. These results, combined with *in vitro* findings (Example 1), demonstrate that IL-21 is a Th2 cytokine.

Example 3. IL-21 specifically inhibits production of IFN γ in developing Th cells.

Because IL-21 shares a similar expression profile in Th cells as well as structural similarity to IL-4, the ability of IL-21, like IL-4, to influence Th differentiation directly was determined.

To determine the effect of IL-21 on Thp differentiation, Thp cells were cultured under neutral, Th1 and Th2 skewing conditions.

Purified naïve Thp cells were primed under neutral, Th1, and Th2 skewing conditions in the presence and absence of IL-21. The cytokine potential of these cells was assessed by intracellular cytokine staining after one week in culture.

The results are shown in FIGS. 2A and 2B. For the results shown in FIG. 2A, cells were cultured for one week in the presence of IL-21 or mock supernatants. Cytokine production was assessed by intracellular cytokine staining four hours after restimulation with PMA/Ionomycin. Results are representative of at least ten experiments.

As with IL-4, addition of IL-21 to neutral and Th1 cultures resulted in a marked reduction in the number of IFN γ producing cells (FIG. 2A, neutral and Th1 conditions). The decreased

number of IFN γ producing cells in Th1 cultures was confirmed by ELISPOT analysis. However, unlike what was observed with IL-4, IL-21 by itself was unable to potentiate the production of IL-4 producing Th2 cells (FIG. 2A, neutral condition). IL-21 treatment had no stimulating or inhibitory effect on the generation of IL-4 producing cells under Th2 skewing conditions (FIG. 2A, Th2).

The ability of IL-21 to affect IFN γ production from recently stimulated Thp cells was determined. Purified naïve Thp cells were cultured under neutral and Th1 conditions in the presence or absence of IL-21 for 48 hours. The resulting culture supernatants were examined for IFN γ production using ELISA. It was found that IL-21 reduced the amount of IFN γ produced early in differentiating cultures (FIG. 2B). Therefore, the presence of IL-21 during Th priming affects the ability of both differentiating Th1 cells and effector cells to produce IFN γ .

Example 4. IL-21 does not directly inhibit IFN γ production from Th1 effector cells.

To determine whether IL-21 directly represses production of IL-21, or instead affects differentiation of IFN γ cells, purified naïve Thp cells were cultured under Th1 skewing conditions. IL-21 or mock supernatant was added either at the beginning of culture (Day 0) or 24 hours before restimulation and analysis (Day 5). Cytokine production was assessed by intracellular cytokine staining. The results are shown in FIG. 3A.

Unlike what was observed when IL-21 was added at Day 0, the addition of IL-21 to Th1 cultures at the end of the differentiation period had no effect on IFN γ production, even though Th1 cells express IL-21R and are responsive to IL-21. This finding demonstrates the IL-21 impairs the ability of Thp cell differentiation into IFN γ -producing Th1 cells, but does not directly inhibit IFN γ production from Th1 effector cells.

Example 5. IL-21 inhibition of IFN γ is independent of Stat6.

The ability of IL-4 to inhibit the differentiation of Th1 cells depends on the expression of Stat6 (Kaplan, M.H., et al., Immunity 4: 313-9, 1996, Takeda, K. et al., Nature 380: 627-30 1996, and Shimoda, K. et al., Nature 380: 630-3, 1996).

27
27

In order to determine whether IL-21 mediated inhibition of IFN γ production is also dependent on Stat6, the ability of IL-21 to influence Th1 differentiation in cells lacking Stat6 was determined. Thp cells purified from wild-type or Stat6-deficient mice were cultured for one week under Th1 skewing conditions in the presence of IL-21 or mock supernatant. Cytokine production was assessed by intracellular cytokine staining.

The results are shown in FIG. 3B. In the absence of Stat6, IL-21 was just as effective in preventing the generation of IFN γ producing cells as in the presence of Stat6. Therefore, unlike IL-4, IL-21 does not depend on Stat6 signaling to prevent the generation of IFN γ producing Th1 cells. Additionally, these results demonstrate that the repression of IFN γ induced by IL-21 is not mediated directly through the action of IL-4.

Example 6. IL-21 does not inhibit other Th1 cytokines

To determine if IL-21 affects aspects of Th1 development in addition to inhibition of IFN γ production, the ability of IL-21 treated Th1 cells to produce other Th1-associated cytokines was examined.

Thp cells were cultured under Th1 skewing conditions in the presence of IL-21, or of mock supernatants, after which they were assessed for cytokine production by intracellular cytokine staining after secondary stimulation.

The results are shown in FIG. 3C. Surprisingly, although the number of IFN γ producing cells is significantly reduced when IL-21 is included in the priming conditions, the same cell population had normal numbers of IL-2 and TNF α producing cells. These results demonstrate that although IL-21 efficiently suppresses the ability of Th1 cells to produce IFN γ , the same cells maintain the capacity to produce Th1 cells and do not default to produce Th2 cytokines.

Example 7. T-bet expression is unaffected by IL-21

T-bet is a recently identified transcription factor that is specifically expressed in differentiating Th1 cells and which is also capable of potently inducing IFN γ . To determine if IL-21 treatment of differentiating Th1 cells affected the induction of T-bet expression in Th cells,

Thp cells were cultured under Th1 or Th2 skewing conditions. Protein extracts were harvested at the beginning (naïve) and 48 hours after culture (Th1 and Th2). T-bet and actin expression were determined by western blot.

The results are shown in FIG. 4A. IL-21 or mock supernatants were included in the indicated cultures. As expected, T-bet expression was induced in Th1 cultures and remained low under Th2 conditions. Addition of IL-21 had no effect on T-bet expression in Th1 cells. This result indicates that IL-21-mediated expression of IFN γ expression is not a result of reduced T-bet expression.

Example 8. IL-21 inhibits IL-12 signaling.

IL-12 signaling is reported to play an important role in the development of Th1 cells. Th cells lacking IL-12R are severely compromised in their ability to produce IFN γ (Wu, C., et al., J Immunol 159: 1658-65, 1997). Additionally, IL-12R β 2 chain expression is specifically extinguished in developing Th2 cells, an effect mediated by IL-4 (Szabo, S.J., et al., J Exp Med 185: 817-24, 1997). In order to determine if IL-21, like IL-4, affects the expression of IL-12 β 2 chain in Th1 cells, RNA from naïve Thp cells cultured under Th1 and Th2 skewing conditions in the presence and absence of IL-21 was analyzed for 12R β 2 expression by RealTime PCR. Thp cells were cultured under Th 1 or Th2 skewing conditions for one week. IL-21 or mock supernatant was included in indicated cultures. RNA was harvested 24 hours after secondary stimulation with anti-CD3 and assessed for IL-12R β 2 expression by RealTime PCR.

The results are shown in FIG. 4B. The results are representative of three independent experiments. As expected, IL-12R β 2 expression was high in Th1 cells when compared to Th2 cells. However, addition of IL-21 to the Th1 cultures did not affect IL-12R β 2 expression. Therefore, unlike results reported for IL-4, IL-21 did not cause decreased expression of IL-12R β 2. Moreover, the high IL-12R β 2 expression coupled with high TNF α and IL-2 levels suggest that IL-21 treated Th1 cells maintain many Th1 characteristics with the distinct exception of decreased IFN γ production.

28

Stat4 is specifically activated by IL-12 and is reported to be a critical mediator for the generation of IFN γ producing Th1 cells (Wurster, A.L., et al., Oncogene 19: 2577-84, 2000). In order to determine if IL-21 affects the ability of IL-12 to activate STAT-4, naïve Thp cells were activated for 48 hours in the presence or absence of IL-21. The cells were subsequently stimulated with IL-12, and the extent of Stat4 phosphorylation was determined by western blot analysis. Thp cells were stimulated with anti-CD3 for 48 hours in the presence of IL-21 or mock supernatants. Protein extracts were assessed for phosphorylated Stat4 (p-Stat4), Stat4 and Stat1 by western blot. Results are representative of four independent experiments.

The results are shown in FIG. 4C. Although IL-21 treated cells were found to express normal levels of IL-12R β 2, Stat4 phosphorylation in response to IL-12 stimulation was reduced in IL-21 treated cells. The decreased levels of phosphorylated Stat4 is also reflected by a decrease in total Stat4 protein levels. As a comparison, Stat1 protein was unaffected by IL-21 treatment.

Stat4 RNA levels were also examined. Thp cells were cultured as described for FIG. 4C, after which RNA was harvested and assessed for Stat4 expression in duplicate by RealTime PCR.

The results are shown in FIG. 4D. Results are representative of three independent experiments. Lower levels of Stat4 RNA levels were detected. The IL-21 induced decrease in Stat4 protein levels is likely due to a decrease in Stat4 mRNA. These findings suggest that IL-21 hinders the responsiveness of developing Th1 cells to IL-12 through a reduction of Stat4 gene expression.

Example 9. IL-21 signaling is required for limiting a Th1 response in vivo.

To determine if endogenously produced IL-21 plays a role in limiting Th1 cell function in vivo, the extent of delayed-type hypersensitivity response (DTH) was examined in IL-21R-deficient mice. DTH is a classic Th1 cell-mediated inflammatory response. IL-21R-deficient mice backcrossed on the C57BL/6 background were generated as described in Kasian et al., Immunity 16:559-60, 2002. Eight week old male mice were immunized subcutaneously with

100mg TNP-KLH (2,4,6-trinitrophenyl-keyhole limpet hemocyanin; Biosearch Technologies, Novato, CA) emulsified in DFA at the tail base. After six days mice were challenged with 50 µg of TNP-KLH in one hind footpad and PBS in the contralateral hind footpad. Footpad thickness was measured 24 hours after challenge.

5 The results are presented in FIG. 5A. Specific footpad swelling of wild type and IL-21R-deficient (IL-21R^{-/-}) mice was determined by subtracting nonspecific swelling the PBS-injected footpad from TNP-KLH-induced swelling. Each data point represents one mouse. Horizontal lines indicate averages. Results reflect pooling of data from two independent experiments. The results demonstrate that wild type animals responded to antigenic challenge with robust swelling
10 of the footpad. Surprisingly, IL-21R-deficient mice mounted a much stronger DTH response, resulting in an average of twice the swelling.

IFNγ production was also examined in immunized mice. The results are shown in FIG. 5B. Purified CD4⁺ T cells from draining lymph nodes of immunized mice were stimulated in vitro with 250 mg/ml TNP-KLH. Supernatants were analyzed for IFNγ levels by ELISA. Results
15 shown are the average of data from two mice from each genotype performed in duplicate. The increased DTH response in IL-21R-deficient animals correlated with a marked increase in IFNγ production from CD4⁺ cells purified from the draining lymph nodes and restimulated by antigen in vitro.

These results demonstrate that IL-21 is involved in limiting TH1 cell responses by
20 suppressing the production of IFNγ.

Additional embodiments are within the claims.

29

What is claimed is:

1. A method for inhibiting interferon gamma (IFN γ) levels in a T cell or cell population, comprising:

5 contacting said T cell or cell population with an IL-21 agonist in an amount sufficient to inhibit IFN γ in said T cell or cell population, wherein the agonist is an IL-21 polypeptide comprising an amino acid sequence at least 85% identical to SEQ ID NO: 2 and which is capable of binding to an IL-21R.

10 2. The method of claim 1, further comprising identifying a T cell or cell population in which inhibition of IFN γ levels is desired.

3. A method for promoting differentiation of a Th precursor (Thp) cell or cell population into a Th2 cell or cell population, comprising:

15 contacting said Thp cell or cell population with an IL-21 agonist in amount sufficient to induce differentiation of said Thp cell or cell population into a Th2 cell or cell population, wherein the agonist is an IL-21 polypeptide comprising an amino acid sequence at least 85% identical to SEQ ID NO: 2 and which is capable of binding to an IL-21R.

20 4. The method of claim 3, further comprising identifying a Thp cell or cell population in which differentiation into a Th2 cell or cell population is desired.

5. A method of inhibiting differentiation of a Thp cell or cell population into a Th1 cell or cell population, comprising:

25 contacting said Thp cell or cell population with an IL-21 agonist in an amount sufficient to inhibit differentiation of said Thp cell or cell population into a Th1 cell or cell population, wherein the agonist is an IL-21 polypeptide comprising an amino acid sequence at least 85% identical to SEQ ID NO: 2 and which is capable of binding to an IL-21R.

6. The method of claim 5, further comprising identifying a T cell population in which inhibition of differentiation of said Thp cell or cell population into a Th1 cell or cell population is desired.

5 7. The method of any of claim 1, 3 or 5, wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

8. The method of any of claim 1, 3 or 5, wherein the contacting step is carried out ex vivo, in vitro, or in vivo.

10 9. The method of any of claim 1, 3 or 5, wherein the contacting step is carried out in a mammalian subject.

10. The method of claim 9, wherein the mammalian subject is a human.

15 11. A method for inhibiting differentiation of a Th precursor (Thp) cell or cell population into a Th2 cell or cell population, comprising:

contacting said Thp cell or population with an antagonist of an interleukin-21 (IL-21)/IL-21 receptor (IL-21R) in an amount sufficient to inhibit differentiation of said Thp cell or cell population into said Th2 cell population, wherein the antagonist is selected from the group consisting of an anti-IL21R antibody, an antigen-binding fragment of an anti-IL21R antibody and a soluble fragment of an IL-21R.

20 12. The method of claim 11, further comprising identifying a T cell or cell population in which an inhibition of differentiation of Thp cell or cell population into a Th2 cell or cell population is desired.

25 13. A method for increasing interferon gamma (IFN γ) levels in a T cell or cell population, comprising:

30

contacting said T cell or cell population with an antagonist of an IL-21/IL-21R in an amount sufficient to increase IFN γ levels in said T cell or cell population, wherein the antagonist is selected from the group consisting of an anti-IL21R antibody, an antigen-binding fragment of an anti-IL21R antibody and a soluble fragment of an IL-21R.

5

14. The method of claim 13, further comprising identifying a T cell population in which an increase in IFN γ levels is desired.

10

15. The method of claim 11 or 13, wherein the soluble fragment of an IL-21R comprises an extracellular region of an IL-21 Receptor.

15

16. The method of claim 15, wherein the soluble fragment comprises an amino acid sequence at least 85% identical to amino acids 20 to 235 of SEQ ID NO: 4 and which is capable of binding IL-21.

17. The method of claim 15, wherein the soluble fragment comprises amino acids 1 to 235 of SEQ ID NO:4.

20

18. The method of claim 15, wherein the soluble fragment further comprises an Fc fragment.

19. The method of claim 11 or 13, wherein the antagonist is an anti-IL21R antibody or an antigen-binding fragment thereof.

25

20. The method of claim 12, wherein the T cell population comprises at least one Th1 cell.

21. The method of claim 11 or 13, wherein the contacting step is carried out ex vivo, in vitro or in vivo.

30

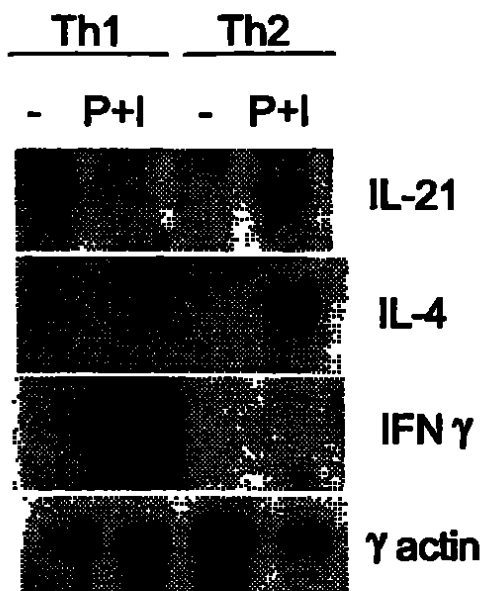
22. The method of claim 21, wherein contacting step is carried out in a mammalian subject.

23. The method of claim 22, wherein the mammalian subject is a human.

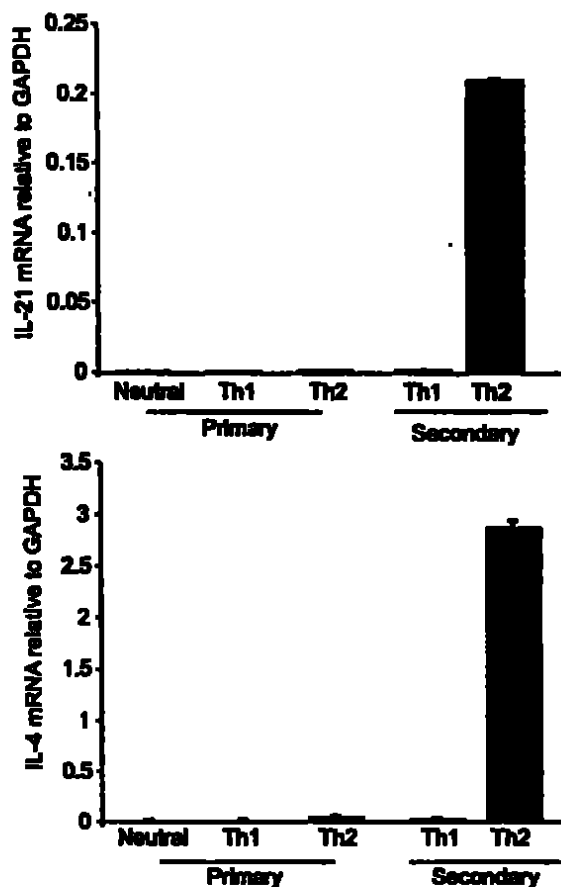
FIGS 1A-1D

31

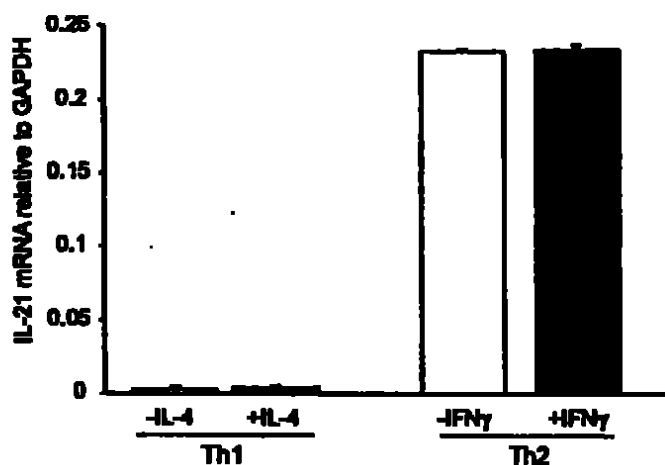
A.



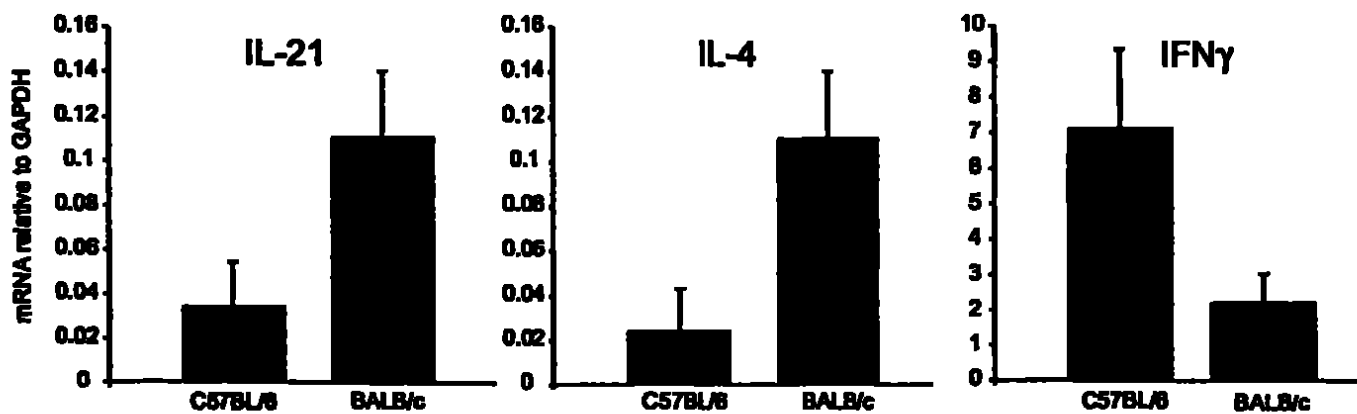
B.



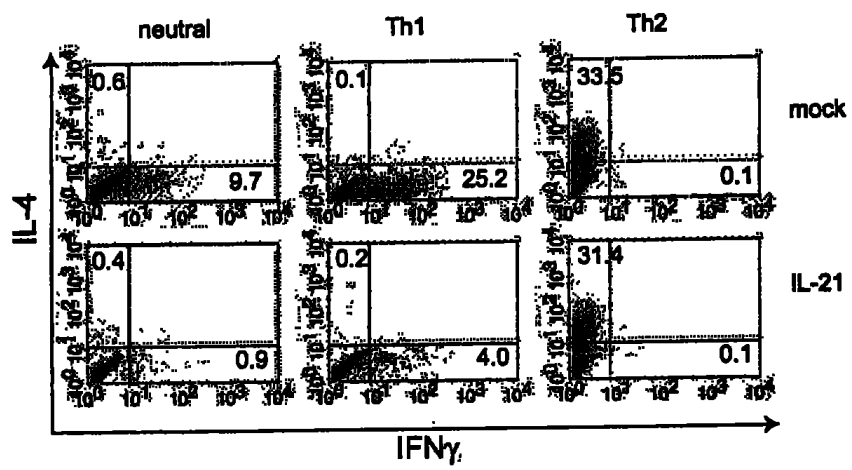
C.



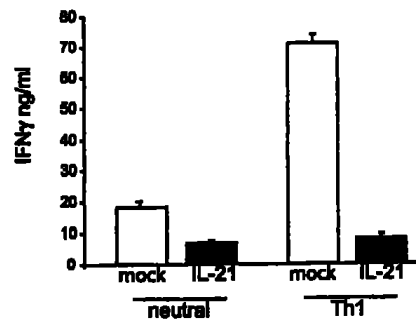
D.



A.



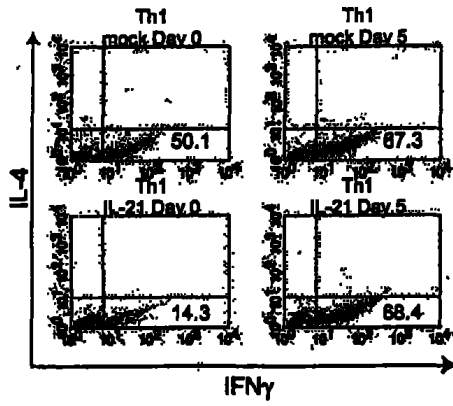
B.



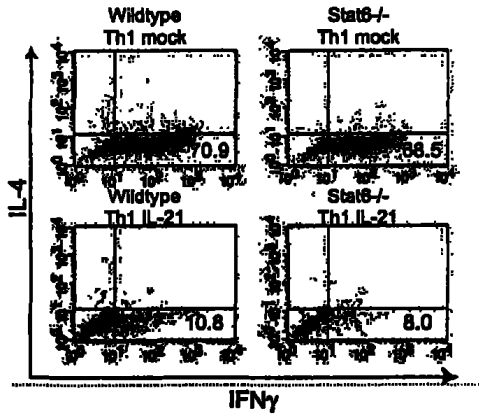
2/5

2/5

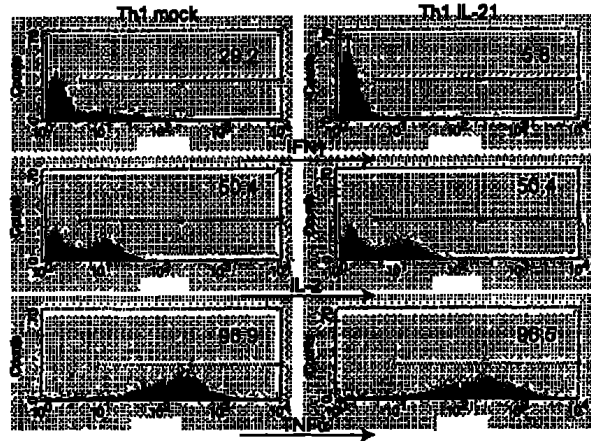
A.



B.



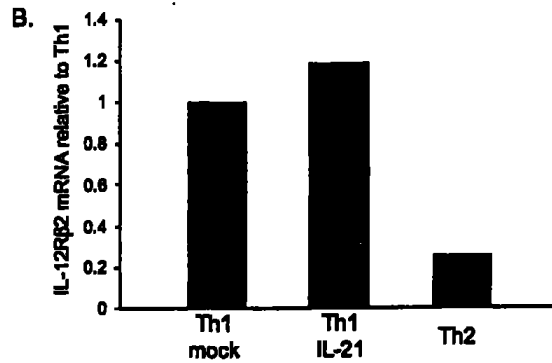
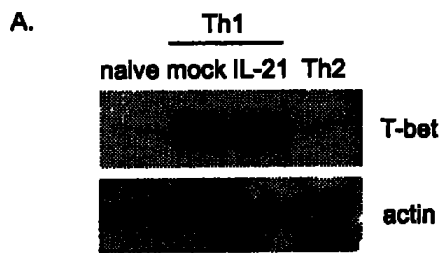
C.



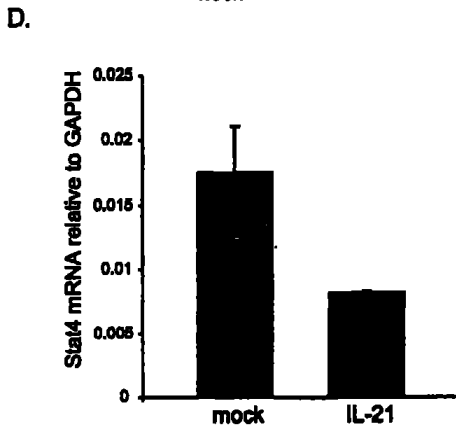
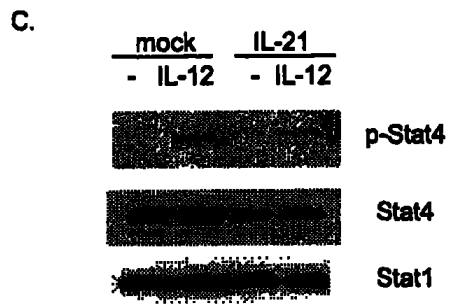
2/3
9/1

3/2

WFO 2004/007682



4/5



PCT/US2003/021975

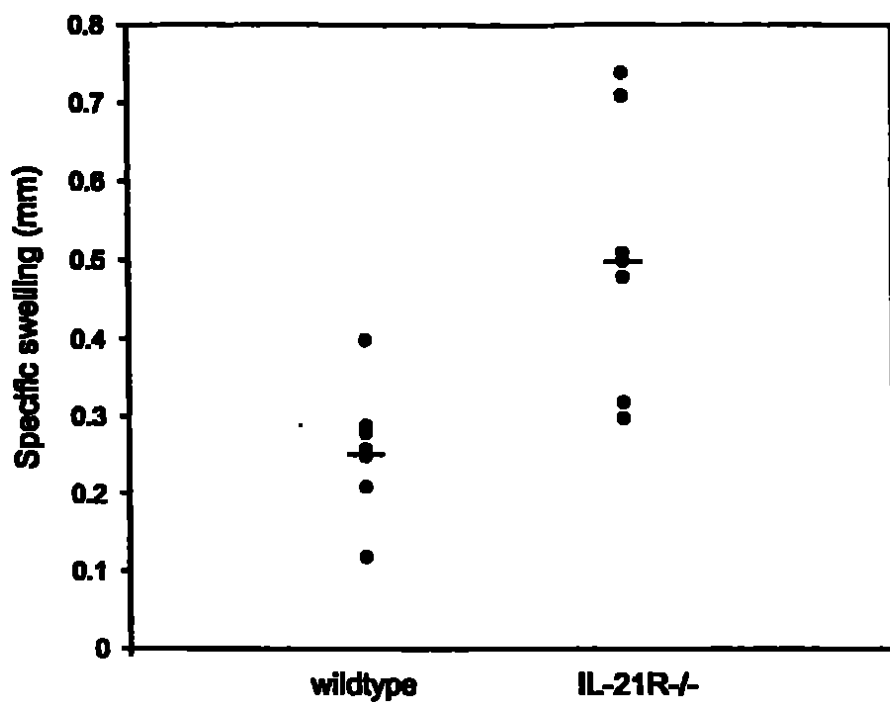
3/2

4/5

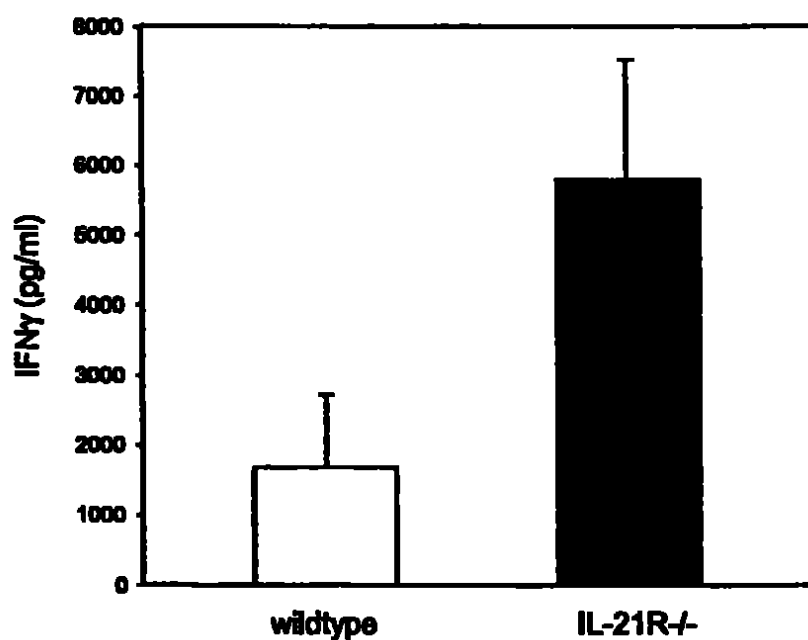
FF6S. 5A & 5B

35

A.



B.



**MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA MODULAR EL DESARROLLO Y LA
FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS T HELPER (T_H)**

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se relaciona con moduladores de la
IL-21, por ejemplo, la actividad o los niveles de la IL-21
humana, y sus usos para modular las células T, por ejemplo,
el desarrollo y función de las células T helper (Th).

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Los subconjuntos de las células T helper
(Th), se distinguen por su capacidad para producir
distintos patrones de citocina y promover respuestas
inmunes específicas. Las células Th1 producen IFN γ y
15 promueven la inmunidad mediada por las células, dirigida
hacia los patógenos intracelulares. En contraste, las
células Th2 producen las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13,
activan los mastocitos y los eosinófilos, y dirigen las
células B contra los patógenos extracelulares. La
20 desregulación de las respuestas de Th puede resultar en
inmunopatología, en que las respuestas aberrantes de Th1
pueden ser responsables de autoinmunidad específica de los
órganos, y las respuestas de Th2 exageradas se han asociado
con enfermedades alérgicas.

25 Las citocinas específicas producidas por las
células Th polarizadas, son los efectores principales que
promueven la diferenciación de las células Th precursoras,

pero estas células también regulan de manera cruzada las otras actividades funcionales del subconjunto. Por ejemplo, se reporta que la IL-4 es un factor potente para promover la diferenciación de las células Thp a las efectoras Th2. Además, la IL-4 antagoniza la producción de IFN γ . La IL-10, otra citocina producida por las células Th2, también se ha descrito que inhibe el desarrollo de Th1 y la función del macrófago inducida por IFN γ . De manera inversa, el IFN γ producido por las células Th1, amplifican el desarrollo de Th1 e inhibe la expansión de las células Th2. La capacidad de estas citocinas para promover el desarrollo de subconjuntos de células Th específicas, mientras que inhibe simultáneamente el destino del desarrollo alternativo, resulta en una respuesta polarizada progresivamente.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención se basa en parte en el descubrimiento de que la citocina interleucina-21 (IL-21), se expresa por un subconjunto de células T helper (Th), las células Th2, e inhibe selectivamente los niveles de interferón γ (IFN γ) durante el desarrollo de las células Th1. Más específicamente, se muestra aquí que la IL-21 se expresa de manera preferida por las células Th2 generadas *in vitro* e *in vivo*. En una modalidad, la exposición de las células Th en desarrollo a IL-21, reduce específicamente los niveles de IFN γ de las células Th1 en desarrollo, y por

lo tanto, potencia las respuestas de Th2. Además, la exposición de las células Th en desarrollo a IL-21, reduce la señalización de Stat4, por ejemplo, reduciendo la proteína Stat4 y/o la expresión del ARNm, modulando por lo tanto la capacidad de respuesta de las células Th a otras citocinas, por ejemplo, IL-12. Así, se describen métodos y composiciones para modular el desarrollo y la actividad de las células Th. Los métodos y las composiciones, por ejemplo, agonistas o antagonistas de IL-21, descritos aquí, son útiles en el tratamiento (por ejemplo, curación, aminoración, retraso o prevención del inicio de, o prevención de la recurrencia o recaída de) o prevención, de trastornos o condiciones asociados con las células Th y/o el IFN γ , tales como trastornos asociados con Th2, por ejemplo, asma, alergia y trastornos asociados con el anticuerpo (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y lupus); y trastornos asociados con Th1, por ejemplo, trastornos autoinmunes (por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes del tipo I, enfermedad de Crohn, psoriasis y myasthenia gravis, entre otros).

En un aspecto, la invención tiene como característica un método para inhibir, por ejemplo, reducir o eliminar los niveles de interferón gamma (IFN γ), en una célula o población de células T. El método proporciona, por ejemplo, inhibir la actividad, expresión, secreción o procesamiento del IFN γ en una célula T, por ejemplo, una

45
célula precursora de la célula T (una célula Thp), o una
célula Th1 (por ejemplo, una célula Th1 diferenciadora o
una célula Th efectora), o en una población de células T
del mismo. El método incluye poner en contacto la célula o
5 población de células T con un agonista de IL-21 en una
cantidad suficiente para inhibir el IFN γ (por ejemplo,
reducir o eliminar), en la célula o población de células T,
de manera que el agonista es un polipéptido de IL-21 que
comprende una secuencia de aminoácidos, que es al menos 85%
10 idéntica a la SEQ ID NO: 2, y la cual es capaz de unirse a
un IL-21R. En algunas modalidades, el método incluye
además identificar una célula o población de células T en
la cual se desea la inhibición de los niveles de IFN γ .

En otro aspecto, la invención tiene como
15 característica un método para promover la diferenciación de
una célula o población de células precursoras de Th (Thp)
en una célula o población de células Th2. En una
modalidad, el método incluye poner en contacto una célula o
población de células Thp con un agonista de IL-21 en una
20 cantidad suficiente para inducir la diferenciación de la
célula o población de células Thp en una célula o población
de células Th2, y el agonista es un polipéptido de IL-21
que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 85%
idéntica a la SEQ ID NO: 2, y que es capaz de unirse a un
25 IL-21R. En algunas modalidades, el método incluye además
identificar una célula o población de células Thp en la
cual se desea la diferenciación en una célula o población

de células Th2.

En otro aspecto, la invención tiene como característica un método para inhibir la diferenciación de una célula o población de células Thp en una célula o población de células Th1. El método incluye poner en contacto la célula o población de células Thp con un agonista de IL-21 en una cantidad suficiente para inhibir la diferenciación de la célula o población de células Thp en una célula o población de células Th1, y el agonista es un polipéptido de IL-21, que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 2, y que es capaz de unirse a un IL-21R. En una modalidad, este método incluye además identificar una población de células T, en la cual se desea la inhibición o la diferenciación de la célula o población de células Thp en una célula o población de células Th1.

En algunas modalidades de estos métodos, el polipéptido incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades de estos métodos, el paso de poner en contacto se lleva a cabo *ex vivo*, *in vitro*, o *in vivo*. Un sujeto adecuado para los métodos *ex vivo* o *in vivo* incluye un sujeto mamífero, por ejemplo, un humano.

En otro aspecto, la invención tiene como característica un método para inhibir la diferenciación de una célula o población de células Th precursoras (Thp) en una célula o población de células Th2. El método incluye poner en contacto la célula o población de células Thp con

un antagonista de una interleucina-21 (IL-21)/receptor de IL-21 (IL-21 R), en una cantidad suficiente para inhibir la diferenciación de la célula o población de células Thp en la población de células Th2, y el agonista se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo anti-IL21R, un fragmento que se une al antígeno de un anticuerpo anti-IL21R y un fragmento soluble de un IL-21R. El método opcionalmente incluye además, identificar una célula o población de células T en la cual se desea una inhibición de la diferenciación de la célula o población de células Thp en una célula o población de células Th2. En algunas modalidades, la población de células T incluye al menos una célula Th1.

En algunas modalidades, el fragmento soluble de un IL-21R, incluye una región extracelular de un receptor de IL-21. Por ejemplo, el fragmento soluble puede incluir una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a los aminoácidos 20 a 235 de la SEQ ID NO: 4, y que es capaz de unirse a IL-21; de manera alterna, el fragmento soluble incluye los aminoácidos 1 a 235 de la SEQ ID NO: 4. En las modalidades relacionadas, el fragmento soluble incluye además un fragmento Fc. En aún otra modalidad, el antagonista es un anticuerpo anti-IL21R o un fragmento que se une al antígeno del anticuerpo anti-IL21R.

En aún otra modalidad, el paso de poner en contacto se lleva a cabo *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*. El paso de poner en contacto puede llevarse a cabo en un

sujeto mamífero, por ejemplo, el sujeto mamífero es un humano.

En otro aspecto, la invención tiene como característica un método para incrementar los niveles de interferón gamma (IFN γ) en una célula o población de células T. El método en una modalidad, incluye poner en contacto la célula o población de células T con un antagonista de IL-21/IL-21R en una cantidad suficiente para incrementar los niveles de IFN γ en la célula o población de células T, y el antagonista se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo anti-IL21R, un fragmento que se une al antígeno de un anticuerpo anti-IL21R y un fragmento soluble de un IL-21R. Una modalidad de este método incluye además identificar una población de células T en la cual se desea un incremento en los niveles de IFN γ .

En algunas modalidades, el fragmento soluble de un IL-21R incluye una región extracelular de un Receptor de IL-21. Por ejemplo, en algunas modalidades, el fragmento soluble comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a los aminoácidos 20 a 235 de la SEQ ID NO: 4, y que es capaz de unirse a IL-21; de manera alterna, el fragmento soluble incluye los aminoácidos 1 a 235 de la SEQ ID NO: 4. En las modalidades relacionadas, el fragmento soluble incluye además un fragmento Fc. En aún otra modalidad, el antagonista puede ser un anticuerpo anti-IL21R o un fragmento que se une a un antígeno del anticuerpo anti-IL21R.

En aún otra modalidad relacionada, el paso de poner en contacto, se lleva a cabo *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*. En algunas modalidades, el paso de poner en contacto se realiza en un sujeto mamífero, por ejemplo, un humano.

5 A menos que se define a de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí, tienen los mismos significados como se entiende comúnmente por alguien con experiencia en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque pueden utilizarse métodos y materiales
10 similares o equivalentes a aquéllos descritos aquí, en la práctica o prueba de la invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas aquí, se incorporan como referencia
15 en su totalidad. En caso de conflicto, regirá la presente especificación, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos únicamente, y no pretenden ser limitantes.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1A es una representación de un análisis
25 de hibridación de transferencia Northern que examina la expresión de la IL-21, IL-4, IFN γ , y actina y bajo varias condiciones sesgadas para Th1 y Th2 descritas en los

Ejemplos anexos.

La Figura 1B es un histograma que muestra el nivel de ARNm de IL-21 con relación a la ARNm de GAPDH en las células Th1 y Th2 después de la estimulación primaria y secundaria.

La Figura 1C es un histograma que muestra el nivel de ARNm de IL-21 con relación al ARNm de GAPDH en las células Th1 y Th2 primarias y secundarias cultivadas en presencia o ausencia de IL-4 e IFN γ .

La Figura 1D es un histograma que muestra el nivel de ARNm de IL-21, el ARNm de IL-4 y el ARNm de IFN γ con relación al ARNm de GAPDH en ratones C57BL/g y BALB/c, después de la infección con *L. major*.

La Figura 2A es una representación gráfica de la producción de la citocina IL-4 e IL-21 en las células Thp cultivadas bajo condiciones neutras, o condiciones sesgadas para Th1.

La Figura 2B es un histograma que muestra la producción de IFN γ en células Thp tratadas con IL-21 o tratadas por simulacro.

La Figura 3A es una representación gráfica de la producción de IL-4 e IFN γ en las células Thp cultivadas bajo condiciones sesgadas para Th1 en la presencia o ausencia de IL-22.

La Figura 3B es una representación gráfica de la producción de IL-4 e IFN γ en células Thp tratadas con IL-21 o tratadas por simulacro en condiciones sesgadas para Th1,

de ratones del tipo silvestres y Stat6-/-.

La Figura 3C es una representación gráfica de la expresión de IFN γ , IL-2 y TNF α en las células Th1 tratadas con IL-21 o tratadas por simulacro de ratones del tipo silvestre y Stat6-/-.

La Figura 4A es una representación del análisis de la transferencia western de los niveles de T-bet y de proteína actina en las células Thp cultivadas bajo condiciones sesgadas para Th1 o Th2.

La Figura 4B es un histograma que muestra los niveles relativos del ARNm de IL-12R β 2 con relación a los niveles en las células Th1.

La Figura 4C es una representación de un análisis de transferencia western de los niveles de Stat4 fosforilada, Stat4, Stat1 y polipéptido de IL-12 en las células Thp estimuladas con anti-CD3 en la presencia de sobrenadantes de IL-21 o simulados.

La Figura 4D es un histograma que muestra los niveles de ARNm de Stat4 con relación al ARNm de GAPDH en células Thp tratadas con IL-21 por simulacro, estimuladas con anti-CD3 durante 48 horas en la presencia de sobrenadantes de IL-21 o simulados. ARNm de IL-4 e IFN γ .

La Figura 5A es una gráfica que muestra la hinchazón específica en ratones del tipo silvestre e IL21-21R-/- inmunizados con TNP-KLH inyectados posteriormente con TNP-KLH o PBS.

La Figura 5B es un histograma que muestra la

producción de IFN γ en las células T CD4+ purificadas de los nodos linfáticos drenantes de ratones del tipo silvestre e IL21-21R-/- inmunizados con TNP-KLH reestimulados por el antígeno.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención proporciona métodos y composiciones para modular la diferenciación, desarrollo y actividad de las células T helper, modulando la interacción entre la IL-21 y el receptor de la IL-21. La IL-21, o agentes que incrementan los niveles de la IL-21 o el receptor de la IL-21 en una población de células, se agregan a una población de células T helper para suprimir los niveles de IFN γ en una población de células Thp o Th1. La IL-21, o agentes que incrementan los niveles de IL-21, también pueden utilizarse para promover el desarrollo de Th2, o para potenciar las respuestas inmunes mediadas por Th2 y/o suprimir el desarrollo de Th1.

La IL-21, o agentes que incrementan los niveles de IL-21, también pueden utilizarse para inhibir los efectos de la IL-12 en una población de células T helper. La IL-21 o agentes que incrementan los niveles de IL-21 o actúan de otra manera como agonistas de la IL-21, pueden utilizarse para suprimir las enfermedades mediadas por Th1 tales como enfermedades autoinmunes, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, y diabetes del tipo I.

En un aspecto, la invención tiene como

característica un método para modular, por ejemplo, incrementar o reducir o inhibir la actividad o el nivel del interferón gamma (IFN γ) en una célula, por ejemplo, una célula T, o una población de células, por ejemplo, una población de células T. Por ejemplo, se proporciona un método para modular uno o más de: actividad, expresión, secreción o procesamiento del IFN γ , en una célula T, por ejemplo, en una célula precursora de la célula T (una célula Thp), o una célula Th1 (por ejemplo, una célula Th1 diferenciadora o una célula Th efectora), o una población de células T del mismo. El método incluye:

(opcionalmente) identificar una célula, por ejemplo, una célula T, o una población de células, por ejemplo, una población de células T, en la cual se desea la modulación (por ejemplo, incremento o reducción) de la actividad o nivel del IFN γ ; y

poner en contacto la célula o la población de células con una cantidad de un modulador de IL-21, por ejemplo, un agonista o antagonista de IL-21, suficiente para modular (por ejemplo, incrementar o reducir) la actividad o nivel del IFN γ en la célula o población de células.

El método objeto puede utilizarse en células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, las células inmunes, por ejemplo, las células T como se describen aquí, pueden cultivarse *in vitro* en un medio de cultivo y el paso de poner en contacto, puede efectuarse

agregando uno o más moduladores de IL-21 (por ejemplo, un agonista o antagonista de IL-21), al medio de cultivo. De manera alterna, el método se realiza en células (por ejemplo, células inmunes o T como se describe aquí),
5 presentes en un sujeto, por ejemplo, como parte de un protocolo *in vivo* (por ejemplo, terapéutico o profiláctico).

En una modalidad, se proporciona un método para reducir o inhibir la actividad o nivel del IFN γ en una
10 célula, por ejemplo, una célula T (por ejemplo, en una célula precursora de una célula T (una célula Thp), o una célula Th1 (por ejemplo, una célula Th1 diferenciadora o una célula Th efectora)), o una población de células del mismo. El método incluye (opcionalmente) identificar una
15 célula, por ejemplo, una célula T, o una población de células, por ejemplo, una población de células T, en la cual se desea la reducción o inhibición de la actividad o nivel del IFN γ ; y poner en contacto la célula o la población de células con una cantidad de un agonista de IL-
20 21, suficiente para reducir o inhibir la actividad o el nivel de IFN γ en la célula o la población de células. De manera preferida, el agonista de IL-21 inhibe específicamente los niveles o la actividad del IFN γ , por ejemplo, no reduce o inhibe la actividad o nivel de otras
25 citocinas tales como IL-2 o TNF α . En una modalidad, el agonista de IL-21 inhibe la producción de IFN γ mediante una célula que produce IFN γ , por ejemplo, una célula Th1 que

produce IFN γ .

En otras modalidades, la invención proporciona un método para reducir los niveles o actividad del IFN γ en un sujeto. El método incluye (opcionalmente), identificar un sujeto en el cual se desea la reducción de los niveles o la actividad del IFN γ ; y administrar al sujeto una cantidad de un agonista de IL-21 suficiente para reducir los niveles o la actividad del IFN γ . El IFN γ puede medirse utilizando técnicas conocidas en el campo, por ejemplo, tinción de la citocina intracelular, o la técnica ELISA para determinar los niveles en los sobrenadantes celulares.

El agonista de IL-21 puede ser un polipéptido de IL-21, un polipéptido de IL-21 humana, o un fragmento activo de los mismos (por ejemplo, un polipéptido de IL-21 humana que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID NO: 2, o codificado por la secuencia nucleotídica mostrada como la SEQ ID NO: 1, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma). En otras modalidades, el agonista de IL-21 es una proteína de fusión que comprende un polipéptido de IL-21, por ejemplo, un polipéptido de IL-21 humana, o un fragmento del mismo fusionado a otro polipéptido, por ejemplo, un polipéptido de inmunoglobulina o una porción del mismo (por ejemplo, una región Fc de un polipéptido de inmunoglobulina); un anticuerpo agonista del receptor de IL-21; un agonista de molécula pequeña. En otras modalidades, el agonista de IL-21 es un agente que incrementa la actividad o el nivel de

IL-21 mediante, por ejemplo, el incremento de la expresión, el procesamiento y/o la secreción de la IL-21 funcional.

De manera preferida, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un sujeto humano que sufre de un trastorno asociado con niveles o actividad del IFN γ aberrantes, por ejemplo, incrementados (por ejemplo, un trastorno mediado por las células T), en una cantidad suficiente para aminorar o prevenir el trastorno.

Los trastornos inmunes ejemplares que pueden tratarse (por ejemplo, aminorarse) o prevenirse tratando el agonista de IL-21 incluyen, por ejemplo, trastornos asociados con Th1, tales como trastornos autoinmunes (incluyendo, de manera no exclusiva, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes del tipo I, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), psoriasis y myasthenia gravis.

La invención tiene como característica adicionalmente, un método para incrementar los niveles de IFN γ en una célula, por ejemplo, una célula T, o una población de células, por ejemplo, una población de células T. Por ejemplo, la invención incluye un método para incrementar la actividad, expresión, secreción o procesamiento del IFN γ , en una célula T, por ejemplo, en una célula precursora de una célula T (una célula Thp), o una célula Th1 (por ejemplo, una célula Th1 diferenciadora o una célula Th efectora), o una población de células T del mismo. El método incluye (opcionalmente) identificar una

célula, por ejemplo, una célula T, o una población de células, por ejemplo, una población de células T, en la cual se desea una expresión incrementada en el IFN γ ; y poner en contacto las células con un antagonista de la IL-21 en una cantidad suficiente para inhibir la unión o la actividad de la IL-21, por ejemplo, inhibir la unión de IL-21 a un receptor de la IL-21, incrementando por lo tanto los niveles de expresión de la IFN γ en la célula.

El antagonista de la IL-21 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o de especificidad única) para la IL-21, por ejemplo, la IL-21 humana, o un receptor de la IL-21, por ejemplo, un polipéptido receptor de la IL-21 humana. De manera preferida, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado, quimérico o generado *in vitro* de la IL-21 humana o polipéptido receptor de la IL-21 humana. En otras modalidades, el antagonista incluye un fragmento de un polipéptido de IL-21, por ejemplo, un dominio de unión al receptor de la IL-21 de un polipéptido de IL-21. De manera alterna, el antagonista incluye un fragmento de un polipéptido receptor de la IL-21, por ejemplo, un dominio de unión a la IL-21 de un polipéptido receptor de la IL-21. En una modalidad, el antagonista es una proteína de fusión que comprende los polipéptidos de IL-21 o del receptor de IL-21 mencionados anteriormente o los fragmentos de los mismos fusionados a una segunda porción, por ejemplo, un polipéptido (por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina).

En otro aspecto, la invención tiene como característica un método para modular, por ejemplo, incrementar o disminuir, la actividad y/o el número de células de las células Th2. En una modalidad, se

5 proporciona un método para modular, por ejemplo, promover o inhibir una o más de la proliferación, supervivencia y/o diferenciación en (por ejemplo, diferenciación de un precursor de una célula T, por ejemplo, un precursor Th (Thp), en), una célula Th2. El método incluye:

10 (opcionalmente) identificar una célula, por ejemplo, una célula T (por ejemplo, una célula Thp o Th2), o una población de células, en donde se desea la modulación de la proliferación, supervivencia y/o diferenciación; y

poner en contacto la célula o la población de

15 células con un modulador de IL-21, por ejemplo, un agonista o antagonista de IL-21, en una cantidad suficiente para modular uno o más de la proliferación, supervivencia y/o diferenciación en (por ejemplo, modular la diferenciación de la célula Thp en una célula Th2), una célula Th2,

20 modulando por lo tanto la actividad y/o el número de células de las células Th2.

El método objeto puede utilizarse en células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, células inmunes, por ejemplo, las células T como se

25 describen aquí, pueden cultivarse *in vitro* en un medio de cultivo y el paso de poner en contacto puede efectuarse agregando uno o más moduladores de IL-21 (por ejemplo, uno

o más antagonistas o agonistas de IL-21) al medio de cultivo. De manera alterna, el método puede realizarse en células (por ejemplo, células inmunes o T, como se describe aquí), presentes en un sujeto, por ejemplo, como parte de un protocolo *in vivo* (por ejemplo, terapéutico o profiláctico).

En una modalidad, se proporciona un método para reducir o inhibir la actividad y/o el número de células de las células Th2. Por ejemplo, la actividad y/o el número de células de las células Th2 puede reducirse o inhibirse, inhibiendo o reduciendo una o más de la proliferación, supervivencia y/o diferenciación en (por ejemplo, diferenciación de un precursor de una célula T, por ejemplo, un precursor Th (Thp), en) una célula Th2. El método incluye (opcionalmente), identificar una célula, por ejemplo, una célula T (por ejemplo, una célula Thp o Th2), o una población de células, en donde se desea la inhibición de la proliferación, supervivencia y/o diferenciación; y poner en contacto la célula o la población de células con un antagonista de la IL-21 en una cantidad suficiente para inhibir o reducir una o más de la proliferación, supervivencia y/o diferenciación en (por ejemplo, inhibir o reducir la diferenciación de la célula Thp en una célula Th2) una célula Th2, inhibiendo o reduciendo por lo tanto la actividad y/o el número de células de las células Th2.

El método objeto puede utilizarse en células, por ejemplo, células T (por ejemplo, células Thp o Th2) en

cultivo, por ejemplo *in vitro* o *ex vivo*.

De manera alterna, el método puede realizarse en células (por ejemplo, células inmunes o T, como se describe aquí), presentes en un sujeto, por ejemplo, como parte de un protocolo *in vivo* (por ejemplo, terapéutico o profiláctico). Por ejemplo, el método puede utilizarse para tratar o prevenir un trastorno mediado por Th2, por ejemplo, asma y alergia en un sujeto. En consecuencia, la invención proporciona un método para tratar (por ejemplo, curar, suprimir, aminorar, retardar o prevenir el inicio de, o prevenir la recurrencia o recaída de), o prevenir un trastorno asociado con Th2 en un sujeto. El método incluye administrar a un sujeto un antagonista de la IL-21 en una cantidad suficiente para inhibir o reducir la actividad y/o el número de células de las células Th2, tratando o previniendo por lo tanto un trastorno asociado con Th2.

De manera preferida, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un humano que sufre de un trastorno asociado con un número o actividad de las células Th2 aberrante, por ejemplo, un trastorno inmune (por ejemplo, un trastorno asociado con Th2). La cantidad suficiente para inhibir o reducir la actividad y/o o número de células, es una cantidad suficiente para aminorar o prevenir el trastorno.

El antagonista de la IL-21 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o de especificidad única) para la IL-21, por ejemplo, IL-21 humana, o un receptor de la IL-21, por

SS

ejemplo, un polipéptido receptor de la IL-21 humana. De manera preferida, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado, quimérico o generado *in vitro* para la IL-21 humana o un polipéptido receptor de la IL-21 humana. En
5 otras modalidades, el antagonista incluye un fragmento de un polipéptido de IL-21, por ejemplo, un dominio de unión del receptor de la IL-21 de un polipéptido de IL-21. De manera alterna, el antagonista incluye un fragmento de un polipéptido receptor de la IL-21, por ejemplo, un dominio
10 de unión de IL-21 de un polipéptido receptor de la IL-21. En una modalidad, el antagonista es una proteína de fusión que comprende la IL-21 o los polipéptidos receptores de IL-21 mencionados anteriormente o fragmentos de los mismos, fusionados a una segunda porción, por ejemplo, un
15 polipéptido (por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina).

En aún otra modalidad, se proporciona un método para incrementar la actividad y/o el número de células de las células Th2. Por ejemplo, la actividad y/o el número de células de las células Th2 puede incrementarse,
20 incrementando una o más de la proliferación, supervivencia y/o diferenciación en (por ejemplo, diferenciación de un precursor de una célula T, por ejemplo, un precursor Th (Thp), en), una célula Th2. El método incluye (opcionalmente) identificar una célula, por ejemplo, una
25 célula T (por ejemplo, una célula Thp o Th2), o una población de células, en donde se desea el incremento de la proliferación, supervivencia y/o diferenciación; y poner en

contacto la célula o la población de células con un agonista de IL-21 en una cantidad suficiente para incrementar una o más de la proliferación, supervivencia y/o diferenciación en, (por ejemplo, incrementar la diferenciación de la célula Thp en una célula Th2) una célula Th2, incrementando por lo tanto la actividad y/o el número de células de las células Th2.

El agonista de IL-21 puede ser 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 la SEQ ID NO: 2, o codificado por una secuencia nucleotídica mostrada como la SEQ ID NO: 1, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma). En otras modalidades, el agonista de IL-21 es una proteína de fusión que comprende un polipéptido de IL-21, por ejemplo, un polipéptido de IL-21 humana, o un fragmento del mismo fusionado a otro polipéptido, por ejemplo, un polipéptido de inmunoglobulina o una porción del mismo (por ejemplo, una región Fc de un polipéptido de inmunoglobulina); un anticuerpo agonista al receptor de la IL-21; o un agonista de molécula pequeña.

En aún otro aspecto, se proporciona un método para modular, por ejemplo, incrementar o disminuir, el número y/o actividad de las células Th1. En una modalidad, se proporciona un método para modular, por ejemplo, promover o inhibir, una o más de la proliferación,

67.
57

supervivencia y/o diferenciación en (por ejemplo, diferenciación de un precursor de una célula T, por ejemplo, un Th precursor (Thp), en), una célula Th1. El método incluye (opcionalmente), identificar una célula, por ejemplo, una célula T (por ejemplo, una célula Thp o Th1), o una población de células, en donde se desea la modulación de la proliferación, supervivencia y/o diferenciación; y poner en contacto la célula o población de células con un modulador de IL-21, por ejemplo, un agonista o un antagonista, en una cantidad suficiente para modular una o más de la proliferación, supervivencia y/o diferenciación en, (por ejemplo, modular la diferenciación de la célula Thp en una células Th1) una célula Th1, modulando por lo tanto la actividad y/o el número de células de las células Th1.

El método objeto puede utilizarse en células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*. Por ejemplo, las células inmunes, por ejemplo, las células T como se describe aquí, pueden cultivarse *in vitro* en un medio de cultivo y el paso de poner en contacto puede efectuarse agregando uno o más moduladores de IL-21 (por ejemplo, un agonista o antagonista de IL-21), al medio de cultivo. De manera alterna, el método puede realizarse en células (por ejemplo, células inmunes o T, como se describe aquí), presentes en un sujeto, por ejemplo, como parte de un protocolo *in vivo* (por ejemplo, terapéutico o profiláctico).

En una modalidad, se proporciona un método para reducir o inhibir la actividad y/o el número de células de las células Th1. Por ejemplo, la actividad y/o el número de células de las células Th1, puede reducirse o inhibirse, inhibiendo o reduciendo una o más de la proliferación, supervivencia y/o diferenciación en (por ejemplo, diferenciación de un precursor de una célula T, por ejemplo, un precursor Th (Thp), en), una célula Th1. El método incluye (opcionalmente), identificar una célula, por ejemplo, una célula T (por ejemplo, una célula Thp, una célula que produce IFN γ , por ejemplo, una célula Th1), o una población de células, en donde se desea la inhibición de la proliferación, supervivencia y/o diferenciación; y poner en contacto la célula o la población de células con un agonista de IL-21 en una cantidad suficiente para inhibir o reducir una o más de la proliferación, supervivencia y/o diferenciación en, (por ejemplo, inhibir o reducir la diferenciación de la célula Thp en una célula Th1) una célula Th1, inhibiendo o reduciendo por lo tanto la actividad y/o el número de células de las células Th1.

El método objeto puede utilizarse en células, por ejemplo, células T (por ejemplo, células Thp o Th2) en cultivo, por ejemplo *in vitro* o *ex vivo*.

De manera alterna, el método puede realizarse en células (por ejemplo, células inmunes o T, como se describe aquí), presentes en un sujeto, por ejemplo, como parte de un protocolo *in vivo* (por ejemplo, terapéutico o

profiláctico). Por ejemplo, el método puede utilizarse para tratar o prevenir un trastorno mediado por Th1, por ejemplo, un trastorno autoinmune (por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes del tipo I, enfermedad de Crohn, psoriasis y myasthenia gravis, entre otros), en un sujeto. En consecuencia, la invención proporciona un método para tratar (por ejemplo, curar, suprimir, aminorar, retardar o prevenir el inicio de, o prevenir la recurrencia o recaída de), o prevenir un trastorno asociado con Th1 en un sujeto. El método incluye administrar a un sujeto un agonista de IL-21 en una cantidad suficiente para inhibir o reducir la actividad y/o el número de células de las células Th1, tratando o previniendo por lo tanto un trastorno asociado con Th1.

De manera preferida, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un humano que sufre de un trastorno asociado con un número o actividad de las células Th1 aberrante, por ejemplo, un trastorno inmune (por ejemplo, un trastorno asociado con Th1, como se describe aquí). Una cantidad suficiente para inhibir o reducir la actividad y/o el número de células de las células TH1, es una cantidad suficiente para aminorar o prevenir el trastorno.

El agonista de IL-21 puede ser 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 la SEQ ID NO: 2, o codificado por una

60

secuencia nucleotídica mostrada como la SEQ ID NO: 1, o una secuencia sustancialmente homóloga a la misma). En otras modalidades, el agonista de IL-21 es una proteína de fusión que comprende un polipéptido de IL-21, por ejemplo, un polipéptido de IL-21 humana, o un fragmento del mismo, fusionado a otro polipéptido, por ejemplo, un polipéptido de inmunoglobulina o una porción del mismo (por ejemplo, una región Fc de un polipéptido de inmunoglobulina); un anticuerpo agonista al receptor de la IL-21; o un agonista de molécula pequeña. En otras modalidades, el agonista de IL-21 es un agente que incrementa la actividad o el nivel de IL-21, por ejemplo, incrementando la expresión, procesamiento y/o secreción de la IL-21 funcional.

En aún otra modalidad, se proporciona un método para incrementar la actividad y/o el número de células de las células Th1. Por ejemplo, la actividad y/o el número de células de las células Th1, puede incrementarse, incrementando una o más de la proliferación, supervivencia y/o diferenciación en (por ejemplo, diferenciación de un precursor de una célula T, por ejemplo, un precursor Th (Thp), en), una célula Th1. El método incluye:

(opcionalmente) identificar una célula, por ejemplo, una célula T (por ejemplo, una célula Thp o Th1), o una población de células, en donde se desea el incremento en la proliferación, supervivencia y/o diferenciación; y

poner en contacto la célula o la población de células con un antagonista de la IL-21 en una cantidad

6X

suficiente para incrementar una o más de la proliferación, supervivencia y/o diferenciación en, (por ejemplo, incrementar la diferenciación de la célula Thp en una célula Th1) una célula Th1, incrementando por lo tanto la actividad y/o el número de células de las células Th1.

El antagonista de la IL-21 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o de especificidad única) para la IL-21, por ejemplo, IL-21 humana, o un receptor de la IL-21, por ejemplo, un polipéptido receptor de la IL-21 humana. De manera preferida, el anticuerpo es un anticuerpo humano, humanizado, quimérico o generado *in vitro* para la IL-21 humana o un polipéptido receptor de la IL-21 humana. En otras modalidades, el antagonista incluye un fragmento de un polipéptido de IL-21, por ejemplo, un dominio de unión del receptor de la IL-21 de un polipéptido de IL-21. De manera alterna, el antagonista incluye un fragmento de un polipéptido receptor de la IL-21, por ejemplo, un dominio de unión de IL-21 de un polipéptido receptor de la IL-21. En una modalidad, el antagonista es una proteína de fusión que comprende la IL-21 o los polipéptidos receptores de la IL-21 mencionados anteriormente, o fragmentos de los mismos, fusionados a una porción secundaria, por ejemplo, un polipéptido (por ejemplo, una cadena de inmunoglobulina).

En aún otro aspecto, la invención tiene como característica un método para modular, por ejemplo, reducir

o inhibir, o incrementar la actividad o el nivel de la interleucina-12 (IL-12) en una célula, población de células, o un sujeto. El método incluye:

(opcionalmente) identificar una célula, por ejemplo, una célula T, una población de células o un sujeto, en donde se desea la modulación de la IL-12; y

poner en contacto la célula o la población de células con, o administrar al sujeto, un modulador de IL-21, por ejemplo, un agonista o un antagonista de IL-21, en una cantidad suficiente para modular la actividad o el nivel de la IL-12 en la célula, población de células, o un sujeto.

En una modalidad, la actividad o nivel de IL-12 se reduce poniendo en contacto la célula o la población de células, o administrando al sujeto, un agonista de IL-21, por ejemplo, un agonista de IL-21 como se describe aquí, en una cantidad suficiente para reducir la actividad o niveles de IL-12.

En otras modalidades, la actividad o nivel de IL-12 se incrementa poniendo en contacto la célula o la población de células, o administrando al sujeto, un antagonista de la IL-21, por ejemplo, un antagonista de la IL-21 como se describió aquí, en una cantidad suficiente para incrementar la actividad o el nivel de IL-12.

En aún otro aspecto, la invención tiene como característica un método para modular, por ejemplo, reducir o inhibir, o incrementar, la Stat, por ejemplo, la

actividad o nivel de Stat 4 en una célula, población de células, o un sujeto. El método incluye:

(opcionalmente) identificar una célula, por ejemplo, una célula T, población de células o un sujeto, en donde se desea la modulación de la actividad o nivel de Stat; y

poner en contacto la célula o la población de células con, o administrar al sujeto, un modulador de IL-21, por ejemplo, un agonista o un antagonista de IL-21, en una cantidad suficiente para modular la actividad o nivel de Stat en la célula, población de células, o un sujeto.

En una modalidad, la actividad o nivel de Stat se reduce poniendo en contacto la célula o la población de células, o administrando al sujeto, un agonista de IL-21, por ejemplo, un agonista de IL-21 como se describió aquí, en una cantidad suficiente para reducir la actividad o el nivel de Stat, por ejemplo, una proteína Stat o ARNm.

En otras modalidades, la actividad o nivel de Stat se incrementa poniendo en contacto la célula o la población de células, o administrando al sujeto, un antagonista de la IL-21, por ejemplo, un antagonista de la IL-21 como se describió aquí, en una cantidad suficiente para incrementar la actividad o nivel de Stat, por ejemplo, proteína Stat o ARNm.

En aún otro aspecto, la invención tiene como característica un método para disminuir, inhibir, suprimir, aminorar o retardar una respuesta inmune (por ejemplo, una

respuesta autoinmune mediada por Th1), en un sujeto. El método incluye administrar a un sujeto en necesidad del mismo, un agonista de IL-21, por ejemplo, un agonista de IL-21 como se describió aquí, en una cantidad suficiente para disminuir, inhibir, suprimir, aminorar o retardar la respuesta autoinmune en el sujeto.

En aún otro aspecto, la invención tiene como característica un método para disminuir, inhibir, suprimir, aminorar o retardar una respuesta asociada con Th2 (por ejemplo, una respuesta alérgica o asmática), en un sujeto. El método incluye administrar a un sujeto en necesidad del mismo un antagonista de la IL-21, por ejemplo, un antagonista de la IL-21 como se describió aquí, en una cantidad suficiente para disminuir, inhibir, suprimir, aminorar o retardar la respuesta asociada con Th2 en el sujeto.

En otro aspecto, la invención tiene como característica un método para identificar de manera selectiva una célula Th2 en una población de células, por ejemplo, una población de células Th, el método comprende determinar los niveles de ácidos nucleicos de la IL-21 (por ejemplo, un producto génico de IL-21) o un polipéptido en una muestra de prueba, por ejemplo, una célula Th, y una muestra de referencia, por ejemplo, una célula Th1; y comparar los niveles del ácido nucleico de la IL-21 en la muestra de prueba con los niveles de ácido nucleico de la IL-21 en la muestra de referencia, por ejemplo, la célula

Th1, en donde un incremento en los niveles del ácido nucleico de la IL-21 en la muestra de prueba con relación a la muestra de referencia, indica que la muestra de prueba es una célula Th2.

5 Como se utiliza aquí, un "trastorno asociado con Th1", es una enfermedad o condición asociada con una actividad o número aberrante de las células Th1, por ejemplo, incrementado o disminuido (por ejemplo, respuestas de la célula Th1 incrementadas o disminuidas), en
10 comparación con una referencia, por ejemplo, un control normal. Los ejemplos de trastornos asociados con Th1 incluyen, por ejemplo, trastornos autoinmunes (por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes del tipo I, enfermedad de Crohn, psoriasis y myasthenia gravis,
15 entre otros).

 Como se utiliza aquí, un "trastorno asociado con Th2", es una enfermedad o condición asociada con una actividad o número aberrante de las células Th2, por ejemplo, incrementado o disminuido (por ejemplo, respuestas
20 de las células Th2 incrementadas o disminuidas), comparadas con una referencia, por ejemplo, un control normal. Los ejemplos de los trastornos de Th2 incluyen, por ejemplo, asma, alergia y trastornos asociados con componentes de anticuerpos (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis
25 múltiple y lupus).

 El polipéptido de IL-21 utilizado en los métodos descritos aquí, puede incluir la secuencia de aminoácidos

de, por ejemplo, un polipéptido de IL-21 de mamífero (tal como roedor, humano, o primate no humano). Por ejemplo, el polipéptido de IL-21 puede incluir la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-21 humana. Una
 5 secuencia de aminoácidos adecuada, es la secuencia de aminoácidos del polipéptido de IL-21 mostrada en la SEQ ID NO: 2 (a continuación).

Los polipéptidos de IL-21 y los receptores de la IL-21, que incluyen secuencias nucleotídicas y de
 10 aminoácidos, se han descrito en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,057,128, Parrish-Novak et al., Nature 408:57-63, 2000; Vossenhreich et al., Curr. Biol. 11:R157-77, 2001, Asao et al., J. Immunol. 167:1-5, 2001; y Ozaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 97:11439-44, 2000.
 15 Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de IL-21, se conocen públicamente. Por ejemplo, la secuencia nucleotídica y la secuencia de aminoácidos de una IL-21 humana, está disponible en Genbank No. de Acceso X_011082. La secuencia nucleotídica de IL-21 humana descrita en esta
 20 entrada, se presenta a continuación:

```

1 gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtacttatga gatccagtc
61 tggcaacatg gagaggattg tcatctgtct gatgggtcatc ttcttgggga cactgggtcca
121 caaatcaagc tcccaagggtc aagatcgcca catgattaga atgcgtcaac ttatagatat
181 tgttgatcag ctgaaaaatt atgtgaatga cttggtccct gaatttctgc cagctccaga
241 agatgtagag acaaaactgtg agtgggtcagc ttttctctgc ttccagaagg cccaactaaa
301 gtcagcaaat acaggaanaca atgaaggat aatcaatgta tcaattaaaa agctgaagag
361 gaaaccacct tccacaatg cagggagaag acagaaacac agactaacat gcccttcacg
421 tgattcttat gagaaaaaac caccanaga attcctagaa agattcaaat cacttctcca
481 aaagatgatt catcagcatc tgtcctctag aacacacgga agtgaagatt cctgaggatc
541 taacttgacg ttggacacta tggtacatac tctaataatag tagtgaaagt catttctttg
601 tattccaagt ggaggag (SEQ ID NO:1)

```

La secuencia de aminoácidos codifica por la

67

secuencia de ácidos nucleicos de IL-21 humana descrita, se presenta a continuación:

MRSSPGNMERIVICLMVIFLGTLVHKSSSQGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEF
LPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRL
TCPCDSYEEKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO:2).

5 La secuencia nucleotídica de un ácido nucleico receptor de la IL-21 humana se proporciona a continuación:

```

1 gaagcagcag gtacccccctc cacatcccta gggctctgtg atgtaggcag aggcccgtag
61 gagtcagcat gccgcgtggc tgggcccgc ccttgctcct gctgctgctc cagggaggct
121 ggggctgccc cgacctcgtc tgotacaccg attacctcca gacggctcatc tgcacctg
181 aaatgtggaa cctccacccc agcagctca ccctacctg gcaagaccag tatgaagagc
241 tgaaggacga ggccacctcc tgcagcctcc acaggtcggc ccacaatgcc acgcatgcca
301 cctacacctg ccacatggat gtattccact tcatggccga cgacattttc agtgtcaaca
361 tcacagacca gtctggcaac tactcccagg agtgtggcag ctttctcctg gctgagagca
421 tcaagccggc tcccccttc aacgtgactg tgaccttctc aggacagtat aatatctcct
481 ggcgctcaga ttacgaagac cctgccttct acatgctgaa gggcaagctt cagtatgagc
541 tgcagtacag gaaccgggga gacccctggg ctgtgagtcc gaggagaaag ctgatctcag
601 tggactcaag aagtgtctcc ctctccccc tggagtccg caaagactcg agctatgagc
661 tgcaggtgag ggcagggccc atgcctggct cctcctacca ggggacctgg agtgaatgga
721 gtgacctggt catctttcag acccagtcag aggagttaa ggaaggctgg aacctcacc
781 tgctgcttct cctcctgctt gtcatagtct tcattcctgc cttctggagc ctgaagacc
841 atccattgtg gaggctatgg aagaagatat gggccgtccc cagccctgag cggttcttca
901 tgcccctgta caagggtgctc agcggagact tcaagaaatg ggtgggtgca cccttcactg

```

961 gctccagcct ggagctggga ccctggagcc cagaggtgcc ctccaccctg gaggtgtaca
 1021 gctgccaccc accacggagc ccggccaaga ggctgcagct cacggagcta caagaaccag
 1081 cagagctggt ggagtctgac ggtgtgcccc agcccagctt ctggccgaca gcccagaact
 1141 cggggggctc agcttacagt gaggagaggg atcggccata cggcctggtg tccattgaca
 1201 cagtgactgt gctagatgca gaggggccat gcacctggcc ctgcagctgt gaggatgacg
 1261 gctacccagc cctggacctg gatgctggcc tggagcccag cccaggccta gaggaccac
 1321 tcttggtatg agggaccaca gtccctgtcct gtggctgtgt ctcagctggc agccctgggc
 1381 taggagggcc cctgggaagc ctccctggaca gactaaagcc accccttgca gatggggagg
 1441 actgggctgg gggactgccc tggggtggcc ggtcacctgg aggggtctca gagagtgagg
 1501 cgggctcacc cctggccggc ctggatatgg acacgtttga cagtggcttt gtgggctctg
 1561 actgcagcag ccctgtggag tgtgacttca ccagccccgg ggacgaaggc cccccccgga
 1621 gctacctccg ccagtgggtg gtcatctctc cggcactttc gagccctgga cccagggcca
 1681 gctaattgagg ctgactggat gtccagagct ggccaggcca ctgggcccctg agccagagac
 1741 aaggtcacct gggctgtgat gtgaagacac ctgcagcctt tggctctctg gatgggcctt
 1801 tgagcctgat gtttacagtg tctgtgtgtg tgtgtgcata tgtgtgtgtg tgcatatgca
 1861 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtc ttaggtgcgc agtggcatgt ccacgtgtgt gtgtgattgc
 1921 acgtgcctgt gggcctggga taatgcccac ggtactccat geattcacct gccctgtgca
 1981 tgtctggact cacggagctc acccatgtgc acaagtgtgc acagtaaacg tgtttgtggt
 2041 caacagatga caacagccgt cctccctcct agggctcttg gttgcaagtt ggtccacagc
 2101 atctccgggg ctttgtggga tcagggcatt gcctgtgact gaggcgagc ccagccctcc
 2161 agcgtctgcc tccaggagct gcaagaagtc catattgttc cttatcacct gccaacagga
 2221 agcgaaggag gatggagtga gcccatggtg acctcgggaa tggcaatttt ttgggcggcc
 2281 cctggacgaa ggtctgaatc cagactctga taccttctgg ctgtgctacc tgagccaagt
 2341 cgcctccctc ctctgggcta gagtttcctt atccagacag tggggaaggc atgacacacc
 2401 tgggggaaat tggcgatgtc acccgtgtac ggtacgcagc ccagagcaga cctcaataa
 2461 acgtcagctt ccttccttct gcggccagag ccgaggcggg cgggggtgag aacatcaatc
 2521 gtcagcgaca gcctgggcac ccgccccgct gtcccgcctg cagagggcca ctcggggggg
 2581 ttccagagct taaaatcagt ccgtttcgtc tcttggaac agctccccac caaccaagat
 2641 ttctttttct aacttctgct actaagttt taaaaattcc ctttatgcac ccaagagata
 2701 tttattaaac accaattacg tagcaggcca tggtcatgg gaccaccccc ccgtggcact
 2761 catggagggg gctgcaggtt ggaactatgc agtgtgctcc ggccacacat cctgctgggc
 2821 cccctacctt gcccatttc aatcctgcca ataatcctg tcttatttgt tcatcctgga
 2881 gaattga (SEQ ID NO:3)

La secuencia descrita de ácidos nucleicos del
 receptor de la IL-21, codifica un polipéptido con la
 5 siguiente secuencia de aminoácidos:

MPRGWAAPLLLLLLQGGWGPCDLVCYTDYLTQVICILEMMELHPSTLLTLTWQDQYEELKDEATSCSLHRSARNATHAT
 YTCMDVVFHFMADDIFSVNITDQSGNYSQECGSFLLAESIKPAPPFNVTVTFSGQYNISWRSDYEDPAFYMLKGLQY
 ELQYRNRGDPWAVSPRRKLISVDSRSVSLPLEFRKDSSEYELQVEAGFMPGSSYQGTWSEWSDPVIPTQSEELKEGW
 MPHLLLLLLLVIVFIPAFNBLKTHPLWRLNKKIWA VPSPERFFMPLYKGCSDPFKXVGAFFTGSSLELPNBPVPS
 TLEVYSCEPPRSPAKRLQLTELQEPALVESDGVFKPSFWPTAQNSSGSAYSSEERDRPYOLVBI DTVTVLDAEGPCTW
 PCSCEDDGYFALDLDAGLEPSFGLKDFLLDAGTTVLSCGCVSAGSFGLOGLGSLLDRLKPFPLADGEDWAGGLPWGGR
 SPGGVSESEAGSFLAGLDMDTFDSGFVGSDCSSPVSCDFTSPGDEGPPRSYLEQNVIIPPLSSPGPQAS (SEQ ID
 NO:4)

La homología de la secuencia de ácidos nucleicos,
 10 puede determinarse como el grado de identidad entre dos

- secuencias nucleotídicas o de aminoácidos. La homología puede determinarse utilizando programas para computadora conocidos en la técnica, tales como el programa GAP proporcionado en el paquete de programas GCG. Véase,
5. Needleman y Wunsch 1970 *J Mol Biol* 48:443-453. Utilizar el programa GAP de GCG con los siguientes ajustes para la comparación de la secuencia de ácidos nucleicos: penalización de creación de GAP de 5.0 y penalización de extensión de GAP de 0.3, la región codificante de las
- 10 secuencias de ácidos nucleicos análogos referidas anteriormente, exhibe un grado de identidad, de manera preferida, de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%, con la parte CDS (codificante) de la secuencia de ADN mostrada en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3. De manera
- 15 similar, las secuencias de aminoácidos referidas aquí, exhiben un grado de identidad, de al menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%, con las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.
- 20 El término "identidad de secuencia", se refiere al grado al cual dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas son idénticas en una base residuo por residuo, sobre una región particular a la de comparación. El término "porcentaje de identidad de la secuencia", se
- 25 calcula comparando dos secuencias alineadas de manera óptima sobre esa región de comparación, determinando el número de posiciones en las cuales la base de ácido

nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, U o I, en el caso de ácidos nucleicos), ocurre en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones que coinciden, dividiendo el número de posiciones que coinciden entre el

5 número total de posiciones en la región de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de la identidad de la secuencia. El término "identidad sustancial", como se utiliza aquí, denota una

10 característica de una secuencia polinucleotídica, en donde el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos 80 por ciento de identidad de la secuencia, de manera preferida al menos 85 por ciento de identidad y con frecuencia del 90 al 95 por ciento de identidad de la

15 secuencia, más usualmente al menos 98 ó 99 por ciento de identidad de la secuencia, cuando se compara con una secuencia de referencia sobre una región de comparación. El término "porcentaje de residuos positivos", se calcula comparando dos secuencias alineadas de manera óptima sobre

20 esa región de comparación, determinando el número de posiciones en las cuales ocurren las sustituciones idénticas y conservadoras de aminoácidos, como se definió anteriormente, en ambas secuencias, para proporcionar el número de posiciones que coinciden, dividiendo el número de

25 posiciones que coinciden entre el número total de posiciones en la región de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para

proporcionar el porcentaje de residuos positivos.

Los agentes que incrementan los niveles de IL-21 o del receptor de la IL-21 en una célula o una población de células, pueden incluir adicionalmente, agonistas de IL-21
5 o agonistas del receptor de la IL-21. Tales agonistas pueden identificarse, identificando compuestos de prueba que ejercen una o más de las actividades que la IL-21 ejerce en poblaciones de células T helper.

El sujeto puede ser un mamífero, por ejemplo, un
10 humano, un primate no humano, un perro, gato, vaca, caballo, cerdo o un roedor (incluyendo una rata o un ratón). Puede utilizarse cualquier ruta de administración deseada de la IL-21. Las rutas adecuadas incluyen forma intravenosa (tanto bolo como infusión), intraperitoneal,
15 subcutánea o intramuscular, todas utilizan formas bien conocidas por aquellos con experiencia en las técnicas farmacéuticas. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas.

20 La administración inyectable parenteral se utiliza generalmente para inyecciones e infusiones subcutáneas, intramusculares o intravenosas.

Antagonistas de la IL-21

25 Para inhibir un efecto de una célula T helper mediada por IL-21, puede agregarse un agente que bloquee o inhiba de otra manera la interacción de la IL-21 a un

receptor de la IL-21 a una célula T o una población de células T, por ejemplo, células T helper. Por conveniencia, estos inhibidores se refieren aquí como "antagonistas de la IL-21". Los ejemplos de los antagonistas de la IL-21 incluyen, por ejemplo, fragmentos solubles de IL-21 o receptores de la IL-21, proteínas de fusión que contienen estos fragmentos, y anticuerpos para estos fragmentos. Los antagonistas de la IL-21 son útiles para bloquear la IL-21 en una enfermedad mediada por Th2, incluyendo una enfermedad mediada por anticuerpos. Estas enfermedades incluyen asma, alergia, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y lupus.

Proteínas de fusión de la IL-21 y el receptor de la IL-21

La IL-21, o un receptor de la IL-21, o fragmentos activos de estas proteínas, pueden fusionarse a moléculas portadoras, tales como inmunoglobulinas para utilizarse en los métodos descritos en la presente. Por ejemplo, las formas solubles del receptor de la IL-21, puede fusionarse a través de secuencias "enlazantes" a la porción Fc de una inmunoglobulina o a la porción Fc de la inmunoglobulina. También pueden utilizarse otras proteínas de fusión, tales como aquéllas con GST (es decir, glutathione S-transferasa), LexA, o MBP (es decir, proteína que se une a la maltosa).

En una modalidad adicional, la proteína de fusión de la IL-21 o el receptor de la IL-21 puede enlazarse a una o más porciones adicionales. Por ejemplo, la proteína de

fusión de IL-21 o el receptor de la IL-21 puede enlazarse además a una proteína de fusión de GST, en la cual las secuencias de la proteína de fusión del receptor de la IL-21 están fusionadas al término C de las secuencias de GST.

5 Tales proteínas de fusión puede facilitar la purificación de la proteína de fusión de la IL-21 o el receptor de la IL-21.

En otra modalidad, la proteína de fusión incluye una secuencia de señal heteróloga (es decir, una secuencia polipeptídica que no está presente en un polipéptido codificado naturalmente por un ácido nucleico de IL-21 o del receptor de la IL-21) en su término N. Por ejemplo, la secuencia de la señal de la IL-21 o el receptor de la IL-21 nativo, puede eliminarse o reemplazarse con una secuencia
10 de señal de otra proteína.
15

Una proteína quimérica o de fusión de la invención puede producirse mediante técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican diferentes secuencias polipeptídicas están
20 ligados juntos en bloque, de acuerdo con las técnicas convencionales, por ejemplo, empleando términos con extremos romos o de extremos escalonados para el ligado, la digestión con enzima de restricción para proporcionar los términos apropiados, el llenado de los extremos cohesivos
25 conforme sea apropiado, el tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión indeseable, y el ligado enzimático. En otra modalidad, el gen de fusión puede

sintetizarse mediante técnicas convencionales, incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. De manera alterna, la amplificación por PCR de los fragmentos génicos puede llevarse a cabo utilizando cebadores de anclaje que dan origen a salientes complementarias entre dos fragmentos génicos consecutivos que pueden recocerse o amplificarse posteriormente 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 porción de fusión (por ejemplo, una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina). Un ácido nucleico que codifica la IL-21 o un receptor de la IL-21 puede clonarse en tal vector de expresión, de manera que la porción de expresión está enlazada en bloque a la proteína de inmunoglobulina.

En algunas modalidades, la porción del polipéptido de IL-21 o del receptor de la IL-21, se proporciona como una variante del polipéptido receptor de la IL-21, que tiene una mutación en la secuencia de IL-21 o del receptor de la IL-21 natural (tipo silvestre), que resulta en una afinidad más alta (con relación a la secuencia no mutada) de unión de la IL-21 alterada para un receptor de la IL-21, o una afinidad mayor (con relación a la secuencia no mutada) del polipéptido del receptor de la IL-21 alterado, para la IL-21.

En algunas modalidades, la porción del

75

polipéptido de IL-21 o el polipéptido del receptor de la IL-21, se proporciona como una variante del polipéptido de la IL-21 o el polipéptido del receptor de la IL-21 que tiene mutaciones en la secuencia de IL-21 o del receptor de la IL-21 natural (tipo silvestre), que resulta en una secuencia de IL-21 o del receptor de la IL-21 más resistente a la proteólisis (con relación a la secuencia no mutada).

Un péptido de señal que puede incluirse en la proteína de fusión es MPLLLLLLLLLPSPLHP (SEQ ID NO: 5). Si se desea, uno o más aminoácidos pueden insertarse adicionalmente entre la primera porción polipeptídica que comprende la porción de IL-21 o del receptor de la IL-21 y la segunda porción polipeptídica.

El segundo polipéptido, es de manera preferida soluble. En algunas modalidades, el segundo polipéptido aumenta la vida media (por ejemplo, la vida media en suero) del polipéptido enlazado. En algunas modalidades, el segundo polipéptido incluye una secuencia que facilita la asociación del polipéptido de fusión con un segundo polipéptido del receptor de la IL-21. En las modalidades preferidas, el segundo polipéptido incluye al menos una región de un polipéptido de inmunoglobulina. Los polipéptidos de fusión de inmunoglobulina se conocen en la técnica, y se describen en, por ejemplo, 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 modalidades, el segundo polipéptido comprende un polipéptido de inmunoglobulina de longitud completa. De manera alterna, el segundo polipéptido comprende un polipéptido de inmunoglobulina con menos que la longitud completa, por ejemplo, una cadena pesada, una cadena ligera, Fab, Fab₂, Fv o Fc. De manera preferida, el segundo polipéptido incluye la cadena pesada de un polipéptido de inmunoglobulina. De manera más preferida, el segundo polipéptido incluye la región Fc de un polipéptido de inmunoglobulina.

En algunas modalidades, el segundo polipéptido tiene una función menos efectora que la función efectora de una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina del tipo silvestre. La función efectora del Fc incluye, por ejemplo, la unión al receptor Fc, la fijación complementaria y la actividad que agota las células T. (Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,136,310). Los métodos para ensayar la actividad que agota las células T, la función efectora de Fc y la estabilidad del anticuerpo se conocen en la técnica. En una modalidad, el segundo polipéptido tiene baja o ninguna afinidad por el receptor Fc. En una modalidad alterna, el segundo polipéptido tiene baja o ninguna afinidad para la proteína complementaria Clq.

Una segunda secuencia polipeptídica preferida, incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6. Esta secuencia incluye una región Fc. Los aminoácidos

subrayados son aquéllos que difieren del aminoácido encontrado en la posición correspondiente de la secuencia de inmunoglobulina del tipo silvestre:

HTCPPCPAPEALGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPVPPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFPLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFPSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:6)

5

Anticuerpos de IL-21 y el Receptor de IL-21

El término "anticuerpo", como se utiliza aquí, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y a porciones
10 inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona con) un antígeno. Tales anticuerpos incluyen, por ejemplo, fragmentos policlonales, monoclonales, quiméricos, de una
15 sola cadena, Fab, Fab' y F(ab')₂, y una biblioteca de expresión de Fab. En general, una molécula de anticuerpo obtenida de humanos, se relaciona con cualquiera de las clases de IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren unas de las otras por la naturaleza de su cadena pesada presente en
20 la molécula. Ciertas clases tienen también subclases, tales como IgG1, IgG2, y otras. Además, en los humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda. La referencia en la presente a los anticuerpos, incluye una referencia para todas de tales clases,
25 subclases y tipos de especies de anticuerpos humanos. Lo anticuerpos para los polipéptidos de IL-21 o del receptor

de la IL-21, también incluye anticuerpos para las proteínas de fusión que contienen los polipéptidos de IL-21 o del receptor de la IL-21 o fragmentos de polipéptidos de IL-21 o del receptor de la IL-21.

5 Un polipéptido de IL-21 o un polipéptido del receptor de la IL-21 puede utilizarse como un antígeno, o una porción o fragmento del mismo, y además puede utilizarse como un inmunógeno, para generar anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente al antígeno, utilizando
10 técnicas estándar para la preparación del anticuerpo policlonal y monoclonal. Los fragmentos peptídicos antigénicos del antígeno para utilizarse como inmunógenos incluyen, por ejemplo, al menos 7 residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la región amino terminal, tal como una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ
15 ID NO: 1 ó 3, y que abarca un epitopo de las mismas, de manera que un anticuerpo que se extiende contra el péptido forma un complejo inmune específico, con la proteína de longitud completa o con cualquier fragmento que contiene el
20 epitopo. De manera preferida, el péptido antigénico comprende al menos 10 residuos de aminoácidos, o al menos 15 residuos de aminoácidos, o al menos 20 residuos de aminoácidos, o al menos 30 residuos de aminoácidos. Los epitopos preferidos abarcados por el péptido antigénico son
25 regiones de la proteína que se localizan en su superficie; comúnmente éstas son regiones hidrofílicas.

En algunas modalidades, al menos un epitopo

abarcado por el péptido antigénico es una región del polipéptido de IL-21 o del receptor de la IL-21 que se localiza en la superficie de la proteína, por ejemplo, una región hidrofílica. Un análisis de la hidrofobicidad del polipéptido de IL-21 o del receptor de la IL-21, indicará 5 cuales regiones de una proteína de IL-21 o del receptor de la IL-21 son particularmente hidrofílicas y, por lo tanto, es probable que codifiquen los residuos superficiales útiles para identificar la producción del anticuerpo. Como 10 un medio para identificar la producción del anticuerpo, pueden generarse gráficas de hidropatía que muestren las regiones de hidrofiliicidad e hidrofobicidad, mediante cualquier método bien conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los métodos de Kyte Doolittle o de Hopp Woods, 15 ya sea con o sin transformada de Fourier. Véase, por ejemplo, Hopp y Woods (1981) Proc. Nat. Acad. Sci. EUA 78: 3824-3828; Kyte y Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-142. Los anticuerpos que son específicos para uno o más dominios dentro de una proteína antigénica, o los 20 derivados, fragmentos u homólogos de los mismos, también se proporcionan aquí.

Una proteína de la invención, o un derivado, fragmento, análogo, homólogo u ortólogo de la misma, puede utilizarse como un inmunógeno en la generación de 25 anticuerpos que se unen inmuno específicamente a estos componentes de la proteína.

Varios procedimientos conocidos dentro de la

80

técnica pueden utilizarse para la producción de anticuerpos policlonales o monoclonales, dirigidos contra una proteína de la invención, o contra derivados, fragmentos, análogos, homólogos u ortólogos de la misma. Véase, por ejemplo, 5 ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Harlow y Lane (1988) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Algunos de estos anticuerpos se discuten a continuación.

Anticuerpos Policlonales

10 Para la producción de los anticuerpos policlonales, varios animales hospederos adecuados (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero), pueden inmunizarse mediante una o más inyecciones con la proteína nativa, una variante sintética de la misma, o un derivado 15 de lo anterior. Una preparación inmunogénica apropiada puede contener, por ejemplo, la proteína inmunogénica natural, un polipéptido sintetizado químicamente que represente la proteína inmunogénica, o una proteína inmunogénica expresada recombinantemente. Además, la 20 proteína puede conjugarse a una segunda proteína conocida por ser inmunogénica en el mamífero que está siendo inmunizado. Los ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen, de manera no exclusiva, la hemocianina de lapa calada, seroalbúmina, tiroglobulina bovina e inhibidor de 25 la tripsina de soya.

La preparación puede incluir además un adyuvante. Varios adyuvantes utilizados para incrementar la

respuesta inmunológica incluyen, de manera no exclusiva, el de Freund (completo e incompleto), geles minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio), sustancias con superficie activa (por ejemplo, lisolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, dinitrofenol, etc.), adyuvantes utilizables en humanos, tales como el Bacilo de Calmette-Guerin y *Corynebacterium parvum*, o agentes inmunoestimuladores similares. Los ejemplos adicionales de adyuvantes que pueden utilizarse incluyen adyuvante MPL-TDM (monofosforilo Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético).

Las moléculas del anticuerpo policlonal dirigidas contra la proteína inmunogénica pueden aislarse del mamífero (por ejemplo, de la sangre), y purificarse además mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía por afinidad, utilizando la proteína A o la proteína G, que proporcionan principalmente la fracción de IgG del suero inmune. En consecuencia, o de manera alterna, el antígeno específico que es el objetivo de la inmunoglobulina buscada, o un epitopo del mismo, puede inmovilizarse en una columna para purificar el anticuerpo específico inmune mediante cromatografía por inmunoafinidad. La purificación de las inmunoglobulinas se discute, por ejemplo, por Wilkinson. Wilkinson (2000) *The Scientist*, 14: 25-28.

25

Anticuerpos Monoclonales

El término "anticuerpo monoclonal" (MAb) o

"composición de anticuerpo monoclonal", como se utiliza aquí, se refiere a una población de moléculas que contienen únicamente una especie molecular de moléculas de anticuerpo que consisten de un único producto génico de cadena ligera y un único producto génico de cadena pesada. En particular, las regiones que determinan la complementaridad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los MAb contienen así, un sitio que se une al antígeno, capaz de inmunorreaccionar con un epitopo particular del antígeno, caracterizado por una única afinidad de unión por éste.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando métodos de hibridoma, tales como aquéllos descritos por Kohler y Milstein (1975) Nature, 256: 495. En un método de hibridoma, un ratón, hámster, u otro animal hospedero apropiado, se inmuniza típicamente con un agente inmunizante, para provocar que los linfocitos produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. De manera alterna, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

El agente inmunizante incluirá típicamente el antígeno de la proteína, fragmentos del mismo o una proteína de fusión del mismo. Generalmente, se utilizan los linfocitos de la sangre periférica si se desean células de origen humano, o se utilizan células de bazo o células de nodo linfático si se desean fuentes de mamífero no humano. A continuación, los linfocitos se fusionan con una

línea celular immortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE, Academic Press, (1986) pp. 59-103. Las

5 líneas celulares immortalizadas son usualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Usualmente, se emplean las líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de

10 cultivo adecuado, que contiene de manera preferida una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células immortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células originales carecen de la enzima hipoxantina guanin fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio

15 de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidita ("medio HAT"), sustancias las cuales evitan el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares immortalizadas preferidas

20 son aquéllas que se fusionan de manera eficiente, soportan un alto nivel estable de expresión del anticuerpo por las células que producen el anticuerpo seleccionado, y son sensibles a un medio, tal como el medio HAT. Las líneas celulares immortalizadas más preferidas, son líneas de

25 mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas,

Virginia. Las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano, también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor (1984) J. Immunol., 133: 3001; Brodeur et al., MONOCLONAL
5 ANTIBODY PRODUCTION TECHNIQUES AND APPLICATIONS, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63).

El medio de cultivo en el cual las células de hibridoma están cultivadas, puede ensayarse para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el
10 antígeno. De manera preferida, la especificidad de la unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por la inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo
15 inmunoabsorbente enlazado por enzima (ELISA). Tales técnicas y ensayos son conocidos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard (1980) Anal. Biochem., 107: 220. De
20 manera preferida, se aíslan los anticuerpos que tienen un alto grado de especificidad y una alta afinidad de unión para el antígeno objetivo.

Después de que las células deseadas del hibridoma se identifican, las clonas pueden subclonarse mediante el
25 procedimiento de dilución limitada y se hacen crecer mediante métodos estándar. Un medio de cultivo adecuado para este propósito incluye, por ejemplo, Medio de Eagle

Modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. De manera alterna, las células de hibridoma pueden hacerse crecer in vivo como ascitos en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por las subclonas pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o el fluido de los ascitos mediante procedimientos de purificación de la inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía con hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía por afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también pueden hacerse mediante métodos de ADN recombinante, tales como aquéllos descritos en la Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse y secuenciarse fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferida para tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, los cuales se transfectan a continuación en células hospederas, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster Chino (CHO), o células de mieloma que de otra manera, no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células

hospederas recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por los dominios constantes de la cadena pesada y ligera en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567; Morrison (1994) Nature 368,812-13), o mediante la unión covalente a la secuencia que codifica la inmunoglobulina, toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no es de inmunoglobulina. Tal polipéptido que no es de inmunoglobulina, puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio que se combina con el antígeno de un anticuerpo de la invención, para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

15

Anticuerpos Humanizados

Los anticuerpos dirigidos contra los antígenos de proteína de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Estos anticuerpos son adecuados para la administración a humanos sin provocar una respuesta inmune por el humano contra la inmunoglobulina administrada. Las formas humanizadas de los anticuerpos son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias que se unen al antígeno de los anticuerpos), que comprenden principalmente la secuencia de una inmunoglobulina humana, y contienen una

20

25

secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. La humanización puede realizarse siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al. (1986) Nature, 321: 522-525; Riechmann et al. (1988) Nature, 332: 323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science, 239: 1534-1536), sustituyendo la secuencia CDR de roedor o CDR para las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. (Véase también la Patente de los Estados Unidos No. 5,225,539). En algunos casos, los residuos de la estructura de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor, ni en las secuencias CDR importadas o de la estructura. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquéllas de la inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de la estructura son aquéllas de una secuencia de consenso de la inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de manera óptima, también comprenderá al menos una porción constante de una región de la inmunoglobulina (Fc), típicamente aquélla de una inmunoglobulina humana (Jones et al., 1986; Riechmann et al., 1988; y Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596).

Anticuerpos Humanos

Los anticuerpos totalmente humanos se relacionan con las moléculas de anticuerpo en las cuales esencialmente toda las secuencias de ambas de la cadena ligera y la cadena pesada, incluyendo las CDR, surgen de genes humanos. Tales anticuerpos se denominan "anticuerpos humanos", o "anticuerpos completamente humanos", en la presente. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse por la técnica del trioma; la técnica del hibridoma de la célula B humana (véase, Kozbor, et al. (1983) Immunol Today 4: 72), y la técnica del hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, et al., 1985 En: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Los anticuerpos monoclonales humanos pueden utilizarse en la práctica de la presente invención y pueden producirse utilizando hibridomas humanos (véase Cote, et al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030), o transformando las células B humanas con Virus de Epstein Barr in vitro (véase Cole, et al. (1985) En: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Además, los anticuerpos humanos también pueden producirse utilizando técnicas adicionales, incluyendo bibliotecas que muestran fagos. Véase, Hoogenboom y Winter (1991) J. Mol. Biol., 227: 381; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222: 581. De manera similar, los anticuerpos humanos pueden hacerse introduciendo lugares específicos de

inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones, en los cuales los genes de la inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Tras el desafío, se observa la producción del anticuerpo humano, el cual se parece estrechamente al observado en los humanos en todos los aspectos, incluyendo el rearreglo génico, el montaje y el repertorio del anticuerpo. Este método se describe, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016, y en Marks et al. (Bio/Technology 10, 779-783 (1992)); Lonberg et al. (Nature 368, 856-859 (1994)); Morrison (Nature 368, 812-13 (1994)); Fishwild et al., (Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996)); Neuberger (Nature Biotechnology 14, 826 (1996)); y Lonberg y Huszar (Intern. Rev. Immunol. 13, 65-93 (1995)).

Los anticuerpos humanos pueden producirse adicionalmente utilizando animales no humanos transgénicos, que se modifican para producir anticuerpos completamente humanos más que los anticuerpos endógenos del animal en respuesta al desafío por un antígeno. Véase la publicación del PCT WO94/02602. Los genes endógenos que codifican las cadenas de inmunoglobulina de las cadenas pesada y ligera en el hospedero no humano se han incapacitado, y se insertan sitios específicos activos que codifican las inmunoglobulinas humanas de cadena pesada y ligera en el genoma del hospedero. Los genes humanos se incorporan, por ejemplo, utilizando cromosomas artificiales de levadura que

contienen los segmentos requeridos de ADN humano. Un animal que proporciona todas las modificaciones deseadas, se obtiene entonces, como la progenie, hibridando los animales transgénicos intermediarios que contienen menos
5 que el complemento completo de las modificaciones. La modalidad preferida de tal animal no humano es un ratón, y se denomina el XenomouseTM, como se describe en las publicaciones del PCT WO 96/33735 y WO 96/34096. Este animal produce células B, que secretan inmunoglobulina
10 completamente humana. Los anticuerpos pueden obtenerse directamente del animal después de la inmunización con un inmunógeno de interés, como, por ejemplo, una preparación de un anticuerpo policlonal, o de manera alterna, de células B inmortalizadas derivadas del animal, tales como
15 hibridomas que producen anticuerpos monoclonales. Además, los genes que codifican las inmunoglobulinas con regiones humanas variables pueden recuperarse y expresarse para obtener los anticuerpos directamente, o pueden modificarse además para obtener análogos de anticuerpos tales como, por
20 ejemplo, moléculas Fv de una sola cadena.

Un ejemplo de un método para producir un hospedero no humano, ejemplificado como un ratón, que carece de la expresión de una cadena pesada de una inmunoglobulina endógena, se describe en la Patente de los
25 Estados Unidos No. 5,939,598. Puede obtenerse por un método que incluye suprimir los genes del segmento J de al menos un sitio específico de la cadena pesada endógena en

una célula germinal embrionica para evitar el rearmallo de los sitios especificos, y para evitar la formación de un transcripto de un sitio especifico de la cadena pesada de inmunoglobulina rearmallada, la supresión se efectúa diversificando un vector que contiene un gen que codifica un marcador seleccionable; y produciendo de la célula germinal embrionica un ratón transgénico, cuyas células somáticas y germinales contienen el gen que codifica el marcador seleccionable.

10 Un método para producir un anticuerpo de interés, tal como un anticuerpo humano, se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,916,771. Incluye introducir un vector de expresión que contiene una secuencia nucleotídica que codifica una cadena pesada en una célula hospedera de mamífero en cultivo, introduciendo un vector de expresión
15 que contiene una secuencia nucleotídica que codifica una cadena ligera en otra célula hospedera de mamífero, y fusionando las dos células para formar una célula híbrida. La célula híbrida expresa un anticuerpo que contiene la
20 cadena pesada y la cadena ligera.

 En una mejora adicional de este procedimiento, en la publicación del PCT WO 99/53049, se describe un método para identificar un epitopo clínicamente relevante en un inmunógeno, y un método correlativo para seleccionar un
25 anticuerpo que se une inmunoespecíficamente al epitopo relevante con alta afinidad.

Fragments Fab y Anticuerpos de una Sola Cadena

De acuerdo con la invención, las técnicas pueden adaptarse para la producción de anticuerpos de una sola cadena, específicos a una sola proteína antigénica de la invención (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4,946,778). Además, los métodos pueden adaptarse para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (véase, ejemplo, Huse, et al. (1989) Science 246: 1275-1281), para permitir una identificación rápida y efectiva de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada para una proteína, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de la misma. Los fragmentos de anticuerpos que contienen los idiotipos para un antígeno de proteína pueden producirse mediante técnicas conocidas en el campo, incluyendo, de manera no exclusiva:

(i) un fragmento $F(ab')_2$ producido por la digestión de pepsina de una molécula del anticuerpo; (ii) un fragmento Fab generado reduciendo los puentes disulfuro de un fragmento $F(ab')_2$; (iii) un fragmento Fab generado por el tratamiento de la molécula del anticuerpo con papaína y un agente reductor y (iv) fragmentos Fv.

Anticuerpos Biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, de manera preferida humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En el caso presente, una de las

especificidades de unión es para una proteína antigénica de la invención. El segundo objetivo de unión es cualquier otro antígeno, y de manera ventajosa, es una proteína de la superficie celular o un receptor o subunidad del receptor.

5 Los métodos para hacer anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos, se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas pesadas tienen
10 diferentes especificidades. (Milstein y Cuello (1983) Nature, 305: 537-539. Debido a la clasificación aleatoria de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas), producen una mezcla potencial de diez diferentes moléculas de anticuerpo, de las cuales sola
15 una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se lleva a cabo usualmente mediante pasos de cromatografía por afinidad. Los procedimientos similares se describen en WO 93/08829, y en Traunecker et al. (1991) EMBO J., 10: 3655-3659.

20 Los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios que combinan el anticuerpo-antígeno), pueden fusionarse a la secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión, de manera preferida, es con un dominio constante de cadena
25 pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la articulación, las regiones CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1)

100

94

que contenga el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo hospedero adecuado. Para los detalles adicionales de la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh et al. (1986) *Methods in Enzymology*, 121: 210.

10 De acuerdo con otro método descrito en WO 96/27011, la interfaz entre un par de moléculas del anticuerpo pueden modificarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La interfaz preferida comprende al menos una
15 parte de la región CH3 de un dominio constante del anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la interfaz de la primera molécula del anticuerpo, se reemplazan con cadenas laterales más grandes (por ejemplo tirosina o triptófano). Las
20 "cavidades" compensadoras de tamaño idéntico o similar a la cadena lateral grande, se crean en la interfaz de la segunda molécula del anticuerpo, reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes con pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para
25 incrementar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como los homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse

95

como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos $F(ab')_2$ biespecíficos). Las técnicas para generar los anticuerpos biespecíficos de los fragmentos de anticuerpo, se han descrito en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden producirse utilizando un enlace químico. Brennan et al. (1985) Science 229: 81, describe un procedimiento en donde los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en la presencia del agente complejante de ditiol de arsenito sódico para estabilizar los ditiolos vecinos, y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados, se convierten a continuación a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab' -TNB, se reconvierte a continuación al Fab' -tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab' -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos, pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Adicionalmente, los fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al. (1992) J. Exp. Med. 175: 217-225, describe la producción de una molécula de anticuerpo $F(ab')_2$ biespecífico, completamente humanizado. Cada fragmento de

LA

96

Fab' se secretó de manera separada de E. coli y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar un anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y las células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra los objetivos del tumor de mama humano.

También se han descrito varias técnicas para hacer y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de un cultivo celular recombinante. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se han producido utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al. (1992) J. Immunol. 148 (5):1547-1553. Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun, se enlazaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región de articulación para formar monómeros, y a continuación se reoxidaron para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos", descrita por Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90:6444-6448, ha proporcionado un mecanismo alternativo para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectados a un dominio variable de cadena ligera (V_L), mediante un enlazante que

20
97

es demasiado corto para permitir que se apareen entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios V_H y V_L de un fragmento son forzados a aparearse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando por lo tanto dos sitios de unión al antígeno. También se ha reportado otra estrategia para hacer los fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de una sola cadena (sFv). Véase, Gruber et al. (1994) J. Immunol. 152:5368.

10 Los anticuerpos con más de dos valencias están contemplados. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt et al. (1991) J. Immunol. 147:60.

Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos diferentes epitopos, al menos uno de los cuales se origina en el antígeno de la proteína de la invención. De manera alterna, el brazo anti-antigénico de una molécula de inmunoglobulina puede combinarse con un brazo que se una a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula de un receptor de una célula T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28 o B7), o receptores Fc para IgG (Fc R), tales como Fc RI (CD64), Fc RII (CD32) y Fc RIII (CD16), para enfocar los mecanismos de la defensa celular a la célula que expresa el antígeno particular. Los anticuerpos biespecíficos, también pueden utilizarse para dirigir los agentes citotóxicos a las células que expresan un antígeno particular. Muchos anticuerpos, poseen un brazo que se una al antígeno, y un brazo que se

721
98

une a un agente citotóxico o un quelante radionuclídico, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al antígeno de la proteína descrito aquí, y se une además al factor del tejido (TF).

5

Composiciones Farmacéuticas

Los moduladores de IL-21 descritos aquí, pueden proporcionarse de manera conveniente en composiciones farmacéuticas. Las composiciones son adecuadas, de manera preferida para uso interno, e incluyen una cantidad efectiva de un compuesto farmacológicamente activo de la invención, solo o en combinación, con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Los compuestos son especialmente útiles en que tienen toxicidad muy baja, si la tienen.

En la práctica, los compuestos o sus sales farmacéuticamente aceptables, se administran en cantidades que serán suficientes para efectuar el cambio deseado, es decir, un incremento o disminución en los niveles de IL-21, y se utilizan en la forma farmacéutica más adecuada para tales propósitos.

Por ejemplo, para la administración oral en la forma de una tableta o cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina), el componente del fármaco activo puede combinarse con un portador oral, inerte, no tóxico farmacéuticamente aceptable, tal como etanol, glicerol, agua y lo similar. Además, cuando se desea o es necesario,

también pueden incorporarse en la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes desintegrantes y agentes colorantes adecuados. Tales aglutinantes incluyen almidón, silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona, azúcares naturales, tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, tragacanto o alginato sódico, polietilenglicol, ceras y lo similar. Los lubricantes utilizados en estas formas de dosificación incluyen oleato sódico, estearato sódico, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio, sílice, talco, ácido esteárico, sus sales de magnesio o calcio y/o polietilenglicol y lo similar. Los desintegrantes incluyen, de manera no exclusiva, almidón, metil celulosa, agar, bentonita, goma xantana, almidones, agar, ácido algínico o su sal sódica o mezclas efervescentes y lo similar. Los diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sucrosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina.

Las composiciones inyectables son de manera preferida, soluciones o suspensiones isotónicas acuosas, y los supositorios se preparan de manera ventajosa a partir de emulsiones y suspensiones grasas. Las composiciones pueden estar esterilizadas y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservadores, estabilizantes, humectantes, o emulsificantes, promotores de la solución, sales para

7/86
100

regular la presión osmótica y/o amortiguadores. Además, pueden contener también otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan de acuerdo con los métodos de mezclado, granulación o recubrimiento
5 convencionales, respectivamente, y contienen aproximadamente 0.1 a 75%, de manera preferida aproximadamente 1 a 50%, del ingrediente activo.

Los compuestos de la invención también pueden administrarse en formas de dosificación oral como tabletas
10 o cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, elíxires, tinturas, suspensiones, jarabes y emulsiones de liberación temporizada y liberación sostenida.

Las composiciones líquidas, particularmente inyectables, pueden prepararse mediante disolución, dispersión, etc. El compuesto activo se disuelve en o se
15 mezcla con un solvente farmacéuticamente puro, tal como por ejemplo, agua, suero fisiológico, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, y lo similar, para formar por lo tanto la solución o suspensión inyectable. Adicionalmente, pueden
20 formularse formas sólidas adecuadas para disolverse en un líquido antes de la inyección. Las composiciones inyectables son, de manera preferida, soluciones o suspensiones isotónicas acuosas. Las composiciones pueden estar esterilizadas y/o contener adyuvantes, tales como
25 agentes conservadores, estabilizantes, humectantes o emulsificantes, promotores de la solución, sales para regular la presión osmótica y/o amortiguadores. Además,

pueden contener también otras sustancias terapéuticamente valiosas.

Los compuestos de la invención pueden administrarse en forma intravenosa (tanto bolo como infusión), intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, todas utilizando formas bien conocidas por aquellos con experiencia en las técnicas farmacéuticas. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas.

La administración inyectable parenteral se utiliza generalmente para las inyecciones e infusiones subcutáneas, intramusculares o intravenosas. Además, un método para la administración parenteral emplea el implante de sistemas de liberación lenta o liberación sostenida, que aseguran que se mantiene un nivel de dosificación constante, de acuerdo con la Patente de los Estados Unidos No. 3,710,795, incorporada aquí como referencia.

Además, los compuestos preferidos para la invención pueden administrarse en forma intranasal vía uso tópico de vehículos intranasales adecuados, o vía rutas transdérmicas, utilizando aquellas formas de parches para la piel transdérmicos bien conocidos por aquellos con experiencia ordinaria en la técnica. Para ser administrado en la forma de un sistema de suministro transdérmico, la administración de la dosificación, por supuesto, será continua más que intermitente a través del régimen de dosificación. Otras preparaciones tópicas preferidas

incluyen cremas, ungüentos, lociones, rocíos en aerosol y geles, en donde la concentración del ingrediente activo variará de 0. 1% al 15%, peso/peso o peso/volumen.

Para las composiciones sólidas, pueden utilizarse los excipientes que incluyen grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sucrosa, carbonato de magnesio y lo similar. El compuesto activo definido anteriormente, puede formularse también como supositorios, utilizando por ejemplo, polialquilenglicoles, por ejemplo, propilenglicol como el portador. En algunas modalidades, los supositorios se preparan de manera ventajosa a partir de emulsiones o suspensiones grasas.

Los compuestos de la invención también pueden administrarse en la forma de sistemas de suministro de liposomas, tales como vesículas unilaminares pequeñas, vesículas unilaminares grandes y vesículas multilaminares. Los liposomas pueden formarse a partir de una variedad de fosfolípidos, que contienen colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas. En algunas modalidades, una película de componentes lipídicos se hidrata con una solución acuosa de fármaco para formar una capa lipídica que encapsula el fármaco, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,262,564.

Los compuestos de la invención también pueden suministrarse mediante el uso de anticuerpos monoclonales como portadores individuales a los cuales se acoplan las

moléculas del compuesto. Los compuestos de la invención también pueden acoplarse con polímeros solubles como portadores identificables del fármaco. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropil-metacrilamida-fenol, polihidroxietil-aspanamidafenol o polietilenoxidopolilisina sustituida con residuos de palmitoilo. Además, los compuestos de la invención pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradables útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, ácido poliláctico, poliepsilon caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidropiranos, policianoacrilatos y copolímeros de bloque reticulados o anfipáticos de hidrogeles.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden insertarse en vectores y utilizarse como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica pueden suministrarse a un sujeto, mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,328,470), o mediante inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 91:3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de la terapia génica puede incluir el vector de la terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la cual se incluye el vehículo de suministro del gen. De manera alterna, en donde el vector

de suministro del gen completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de suministro del gen.

Si se desea, la composición farmacéutica a ser administrada puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsificantes, agentes que amortiguan el pH, y otras sustancias tales como, por ejemplo, acetato de sodio, oleato de trietanolamina, etc.

El régimen de dosificación que utiliza los compuestos, se selecciona de acuerdo con una variedad de factores, incluyendo el tipo, especie, edad, peso, sexo y condición médica del paciente; la severidad de la condición a ser tratada; la ruta de administración; la función renal y hepática del paciente; y el compuesto particular o sal del mismo empleado. Un médico o veterinario con experiencia ordinaria, puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad efectiva del fármaco requerido para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la condición.

Las dosis orales de la invención, cuando se utilizan para los efectos indicados, variarán entre aproximadamente 0.05 a 1000 mg/día oralmente. Las composiciones se proporcionan de manera preferida en la forma de tabletas ranuradas que contienen 0.5, 1.0, 2.5,

105

5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100.0, 250.0, 500.0 y 1000.0 mg del ingrediente activo. Los niveles en plasma efectivos de los compuestos de la invención, varían de 0.002 mg a 50 mg por kg de peso corporal por día.

5 Los compuestos de la invención pueden administrarse en una sola dosis diaria, o la dosificación diaria total puede administrarse en dosis divididas en dos, tres o cuatro veces al día.

10 Cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores puede contener 0.1-99%, de manera preferida 1-70% de la IL-21, el receptor de la IL-21, el agonista de la IL-21, o el antagonista de la IL-21.

15 Si se desea, las composiciones farmacéuticas pueden proporcionarse con un adyuvante. Los adyuvantes se discuten anteriormente. En algunas modalidades, los adyuvantes pueden utilizarse para incrementar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies del hospedero, incluyendo el de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias con
20 superficie activa tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianina de lapa calada, dinitrofenol y potencialmente adyuvantes humanos útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y Corynebacterium parvum. Generalmente,
25 los animales se inyectan con el antígeno utilizando varias inyecciones en serie, de manera preferida, incluyendo al menos tres inyecciones de refuerzo.

La invención será ilustrada además en los siguientes ejemplos no limitantes. Los ejemplos 1-8 se realizaron utilizando los siguientes materiales y métodos.

5

EJEMPLOS**Ratones**

A menos que se indique de otra manera, se utilizaron ratones C57BL/6 de 6-8 semanas de edad en todos los experimentos. Se generaron ratones deficientes en Stat6 con una base deficiente de ratones C57BL/6, como se describe en Kaplan, M. H., et al., Immunity 4: 313-9, 1996.

Preparación y cultivo de los linfocitos

Los linfocitos se cultivaron en RPMI 1640 suplementado como se describe en (Kaplan, M. H., et al., Immunity 4: 313-9, 1996). Las células Thp sin desafiar se purificaron del nodo linfático y de los bazo, mediante clasificación celular utilizando anti-CD4 y anti-CD26L (Pharmingen; BD Life Sciences, San Diego, CA) hasta una pureza del 95-98%.

Anticuerpos y citocinas

El antisuero T-bet específico se preparó como se describe en (Szabo, S. J. et al., Cell 100: 655-69, 2000). Los anticuerpos específicos para Stat4, Stat1 y actina se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Un anticuerpo específico para la Stat4 fosforilada se obtuvo de Zymed (South San Francisco, CA). Los anticuerpos para anti-CD3, anti-CD28, IL-4 e IFN γ utilizados en los cultivos de diferenciación de Th se obtuvieron de Pharmingen. La IL-4 recombinante se obtuvo de Preprotech. La IL-2 recombinante se proporcionó por Chiron (Emeryville, CA). La IL-12 recombinante se proporcionó por Hoffman-LaRoche (Nutley, NJ). Se preparó y concentró la IL-21 de ratón, expresada en sobrenadantes COS. Una unidad de actividad se define como la concentración de sobrenadante requerida para inducir 50% de la proliferación máxima de las células BAF3 transfectadas con IL-21R. El sobrenadante COS transfectado por simulacro, preparado y concentrado en paralelo con IL-21, se utilizó como control.

15 Diferenciación in vitro de las células T helper

Las células T sin desafiar se cultivaron en placas en placas recubiertas con anti-CD3, anti-CD28 (1 μ g/ml) a $1-2 \times 10^6$ /ml en la presencia de 10 ng/ml de IL-4, 10 μ g/ml de anti-IFN γ (condiciones para Th2) o en 1 ng/ml de IL-12, 10 μ g/ml de anti IL-4 (condiciones para Th1). Las células se expandieron en IL-2 (100 U/ml) tres días más tarde. Después de una semana en cultivo, las células se estimularon con PMA/Ionomicina, y la producción de citocina se determinó mediante tinción de la citocina intracelular, como se describe en (Bird, J. J. et al., Immunity 9: 229-37, 1998).

Análisis del ARN

El ARN total se aisló utilizando RNeasy (Qiagen; Valencia, CA). Para los análisis northern, el ARN se separó en un gel de 1.5% de agarosa/6% de formaldehído y se transfirió a una membrana GeneScreen (New England Nuclear). La membrana se hibridó con sondas de ADNc radiomarcado para IL-21, IL-4, IFN γ , γ -actina. Para la PCR RealTime, 1 μ g de ARN se cebó con oligo (dT) y se convirtió a ADNc utilizando Superscript (Invitrogen Life Technologies; Carlsbad, CA). 25 ng de ADNc se utilizaron como un patrón en las reacciones de PCR utilizando una mezcla de SYBR Green 2X o TaqMan 2X PCR (Applied Biosystems; Foster City, CA) y se analizaron en el Detector de Secuencias ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) utilizando los siguientes cebadores:

IL-21 hacia adelante; 5'-aagattcctgaggatccgagaag-3' (SEQ ID NO: 7)

IL-21 inverso: 5'-gcattcgtgagcgtctatagtgtc-3' (SEQ ID NO: 8)

IL-21 sonda TaqMan: 5'-ttcccaggactgaggagacgcc-3' (SEQ ID NO: 9)

IL-12R γ 2 hacia adelante: 5'-tttccatttttgcacatcaagttctc-3' (SEQ ID NO: 10)

IL-12R γ 2 inverso: 5'-ccgatctagagtcagccgct-3' (SEQ ID NO: 11)

Stat4 hacia adelante: 5'-aaacctgagcccaacgacaa-3' (SEQ ID NO: 12)

Stat4 inverso: 5'-agtgtccgtttgcaccgtc-3' (SEQ ID

NO: 13)

Los cebadores y las sondas TaqMan para la IL-4, IFN γ y GAPDH se han publicado previamente (Overbergh, L., et al., Cytokine 11: 305-12 1999).

5

Análisis de inmunotransferencia

Los extractos de células completas se prepararon lisando las células en Tris 50 mM, NP40 0.5%, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM y aclarando los lisados mediante centrifugación.

10 Los extractos de proteína se separaron en gel de poliacrilamida al 8-10% y se transfirieron a una membrana Optitran (Schleicher y Schuell; Keene, NH). Las inmunotransferencias se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente en leche en TBST al 5% (Tris 50 mM, pH

15 7.5, NaCl 100 mM, Tween 20 al 0.03%) y se incubaron con el anticuerpo indicado a 4 grados Centígrados. Las transferencias se lavaron con TBST y se incubaron con anticuerpo conjugado con HRP de anti-conejo (Zymed) a temperatura ambiente. Después de lavar las transferencias

20 con TBST, se realizó la detección utilizando quimioluminiscencia mejorada (Amersham; Piscataway, NJ), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 1. La IL-21 se expresa de manera preferida en

25 las células Th inducidas a desarrollarse *in vitro* a lo largo de la trayectoria Th2.

Se determinó la expresión de la IL-21 en los

subconjuntos de Th. Los análisis northern se realizaron en ARNm de células Thp sin desafiar (precursor de Th), diferenciadas en células Th1 o Th2 durante una semana y reestimuladas durante cuatro horas para inducir la producción de citocina. Los resultados se muestran en las Figuras 1A-1D. Para los resultados mostrados en la Figura 1A, las células Thp se cultivaron bajo condiciones sesgadas para Th1 y Th2 durante 6 días. Las células se dejaron en reposo (-) o se reestimularon con PMA/Ionomicina (P+I) durante 4 horas. El ARN se purificó y se valoró la expresión de la citocina mediante transferencia Northern. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes. La IL-21 que codifica el mensaje se detectó sólo en las células Th2 estimuladas, y en contraste, el mensaje de la IL-21 fue indetectable en los cultivos de Th1. Estos resultados indican que la IL-21 es una citocina específica de Th2.

Para determinar si el potencial para expresar la IL-21 se incrementa conforme las células se desarrollan a lo largo de la trayectoria Th2, la expresión de la IL-21 en las células Thp primarias estimuladas, se comparó con la expresión del mensaje de la IL-21 en las células Th2 secundarias estimuladas. Los resultados se muestran en la Figura 1B. Para los resultados mostrados, las células Thp se cultivaron bajo condiciones neutras y sesgadas de para Th1 y Th2. El ARN se purificó 24 horas después de la estimulación primaria y secundaria con anti-CD3. La

~~4/4~~

11)

expresión de la citocina se valoró por duplicado mediante PCR RealTime y se mostró con relación a GAPDH. Se observó que el mensaje de la IL-21, como la IL-4, es relativamente bajo en las células Thp después de la estimulación primaria. En contraste, la expresión de la IL-21 se incrementó marcadamente después de que se dejaron diferenciar las células a lo largo de la trayectoria Th2. estos resultados demuestran que la expresión del gen de la IL-21 se regula de manera similar a otras citocinas específicas de Th2.

Se determinó el efecto del medio de la citocina en la expresión de la IL-21 en las células diferenciadas. Las células Th1 y Th2 se cultivaron en la presencia de IL-4 e IFN γ , respectivamente, antes de la estimulación secundaria. Las células respondieron a estas citocinas, como se evidencia por la activación de la Stat6 y la Stat1 por la IL-4 y el IFN γ .

Se examinó la capacidad de la IL-4 para restablecer expresión de la IL-21. Los resultados se muestran en la Figura 1C. Las células Thp se cultivaron bajo condiciones sesgadas para Th1 y Th2 durante 5 días. La IL-4 o el IFN γ se agregaron a los cultivos indicados 24 horas antes de la estimulación secundaria con anti-CD3. El ARN se purificó 24 horas después de la estimulación secundaria y la expresión de la IL-21 se valoró por duplicado con relación a GAPDH mediante PCR RealTime. La adición de la IL-4 a las células Th1 no fue capaz de

112

restablecer la expresión de la IL-21 al nivel observado en las células Th2. Además, la adición del IFN γ a los cultivo de Th2 no tuvo un efecto inhibitor en la expresión de IL-21. Estos resultados demuestran que la expresión de la IL-21 en las células Th2 parece fijarse primero en la diferenciación de Th2 y no es modulada directamente por la IL-4 o el IFN γ .

Ejemplo 2. Las células Th2 expresan IL-21 durante una respuesta inmune de Th2 in vivo.

La expresión de la IL-21 en las células Th2 durante una respuesta inmune in vivo se determinó en un sistema de un modelo de protozoario patogénico. La infección con el protozoario *Leishmania major* proporciona un modelo bien caracterizado para estudiar la respuesta in vivo de las células Th (Reiner, S. L., et al., Annu Rev Immunol 13: 151-77,1995). Algunas cepas endógenas de ratón, tales como C57BL/6, infectadas con *L. major* montan una respuesta de Th1 protectora y efectiva contra el patógeno. De manera inversa, otras cepas endógenas de ratón, tales como las cepas de ratones BALB, desarrollan principalmente una respuesta de Th2 y fallan en eliminar la infección.

Ambos ratones C57BL/6 y BALB/c se infectaron con *L. major*. Cohortes de 8 ratones BALB/c y C57BL/6 se infectaron con *L. major* en las almohadillas de las patas traseras. Después de 6 semanas las células T CD4+ de los

nodos linfáticos drenantes se purificaron y estimularon con anti-CD3. El ARN se purificó 6 horas después de la estimulación y la expresión de citocina se valoró con relación a GAPDH mediante PCR RealTime.

5 Los resultados se muestran en la Figura 1D. Como se esperaba, las células CD4+ de los ratones C57BL/6 infectados expresaron más IFN γ que las células de los ratones BALB/c infectados. De manera consistente con una respuesta predominantemente de Th2, las células T CD4+ de
10 los ratones BALB/c infectados, produjeron de manera significativa más IL-4 que las células T de los ratones C57BL/6. De manera similar a lo que se observa bajo condiciones sesgadas para Th2 *in vitro*, la IL-21 también se expresó de manera preferida durante una respuesta de Th2 *in*
15 vivo en los ratones BALB/c. Estos resultados, combinados con las conclusiones *in vitro* (Ejemplo 1), demuestran que la IL-21 es una citocina Th2.

**Ejemplo 3. La IL-21 inhibe específicamente la
20 producción de IFN γ en células Th en desarrollo.**

Debido a que la IL-21 comparte un perfil de expresión similar en las células Th, así como una similitud estructural con la IL-4, se determinó la capacidad de la IL-21, como la IL-4, de influenciar directamente la
25 diferenciación de Th.

Para determinar el efecto de la IL-21 en la diferenciación de Thp, las células Thp se cultivaron bajo

condiciones neutras y sesgadas para Th1 y Th2.

Las células Thp sin desafiar purificadas, se
cebaron bajo condiciones neutras y sesgadas para Th1 y Th2,
en la presencia y ausencia de IL-21. El potencial de
5 citocina de estas células se valoró mediante tinción de la
citocina intracelular, después de una semana en cultivo.

Los resultados se muestran en las Figuras 2A y
2B. Para los resultados mostrados en la Figura 2A, las
células se cultivaron durante una semana en la presencia de
10 sobrenadantes de IL-21 o simulados. La producción de
citocina se valoró mediante la tinción de la citocina
intracelular, cuatro horas después de la reestimulación con
PMA/Ionomicina. Los resultados son representativos de al
menos diez experimentos.

15 Como con la IL4, la adición de la IL-21 a los
cultivos neutros y de Th1 resultó en una marcada reducción
en el número de células que producen IFN γ (Figura 2A,
condiciones neutras y de Th1). El número disminuido de las
células que producen IFN γ en los cultivos de Th1 se
20 confirmó mediante análisis ELISPOT. Sin embargo, a
diferencia de lo que se observa con la IL-4, la IL-21 por
sí misma fue incapaz de potenciar la producción de células
Th2 que producen IL-4 (Figura 2A, condición neutra). El
tratamiento con IL-21 no tuvo un efecto estimulante o
25 inhibidor en la generación de células que producen IL-4
bajo condiciones sesgadas para Th2 (Figura 2A, Th2).

Se determinó la capacidad de la IL-21 para

afectar la producción de IFN γ de células Thp estimuladas recientemente. Las células Thp sin desafiar purificadas, se cultivaron bajo condiciones neutras y para Th1 en la presencia o ausencia de IL-21 durante 48 horas. Los sobrenadantes resultantes del cultivo se examinaron para la producción de IFN γ utilizando ELISA. Se encontró que la IL-21 redujo la cantidad de IFN γ producido inicialmente en los cultivos que se diferencian (Figura 2B). Por lo tanto, la presencia de la IL-21 durante el cebado de Th afecta la capacidad de las células Th1 diferenciadoras y las células efectoras para producir IFN γ .

Ejemplo 4. La IL-21 no inhibe directamente la producción de IFN γ de las células Th1 efectoras.

Para determinar si la IL-21 reprime directamente la producción de IL-21, o en su lugar afecta la diferenciación de las células del IFN γ , las células Thp sin desafiar purificadas, se cultivaron bajo condiciones sesgadas para Th1. Los sobrenadantes de IL-21 o simulados se agregaron ya sea al inicio del cultivo (Día 0) o 24 horas antes de la reestimulación y el análisis (Día 5). La producción de citocina se valoró mediante tinción de la citocina intracelular. Los resultados se muestran en la Figura 3A.

A diferencia de lo que se observó cuando se agregó la IL-21 en el Día 0, la adición de IL-21 a los cultivos de Th1 al final del periodo de diferenciación, no

tuvo un efecto en la producción de IFN γ , aunque las células Th1 expresan el IL-21R y son sensibles a la IL-21. Esta conclusión demuestra que la IL-21 disminuye la capacidad de la diferenciación de la célula Thp en las células Th1 que producen IFN γ , pero no inhibe directamente la producción de IFN γ de las células Th1 efectoras.

Ejemplo 5. La inhibición de la IL-21 del IFN γ es independiente de la Stat6.

La capacidad de la IL-4 para inhibir la diferenciación de las células Th1 depende de la expresión de la Stat6 (Kaplan, M. H., et al., Immunity 4: 313-9, 1996, Takeda, K. et al., Nature 380: 627-30 1996 y Shimoda, K. et al., Nature 380: 630-3, 1996).

Con el fin de determinar si la inhibición mediada por la IL-21 de la producción de IFN γ también es dependiente de la Stat6, se determinó la capacidad de la IL-21 para influenciar la diferenciación de Th1 en las células que carecen de Stat6. Las células Thp purificadas de ratones silvestres o deficientes en Stat6, se cultivaron durante una semana bajo condiciones sesgadas para Th1, en la presencia de sobrenadantes de IL-21 o simulados. La producción de citocina se valoró mediante tinción de la citocina intracelular.

Los resultados se muestran en la Figura 3B. En la ausencia de Stat6, la IL-21 fue tan efectiva para prevenir la generación de células que producen IFN γ que en

la presencia de Stat6. Por lo tanto, a diferencia de la IL-4, la IL-21 no depende de la señalización de Stat6 para prevenir la generación de células Th1 que producen IFN γ . Además, estos resultados demuestran que la represión del IFN γ inducida por la IL-21 no es mediada directamente a través de la acción de la IL-4.

Ejemplo 6. La IL-21 no inhibe otras citocinas Th1

Para determinar si la IL-21 afecta el desarrollo de Th1, además de inhibir la producción del IFN γ , se examinó la capacidad de las células Th1 tratadas con IL-21 para producir otras citocinas asociadas con Th1.

Las células Thp se cultivaron bajo condiciones sesgadas para Th1, en la presencia de sobrenadantes de IL-21 o simulados, después de lo cual se valoraron para la producción de citocina mediante la tinción de la citocina intracelular después de la estimulación secundaria.

Los resultados se muestran en la Figura 3C. De manera sorprendente, aunque el número de células que producen IFN γ se reduce significativamente cuando la IL-21 se incluye en las condiciones de cebado, la misma población de células tuvo números normales de células que producen IL-2 y TNF α . Estos resultados demuestran que aunque la IL-21 suprime de manera eficiente la capacidad de las células Th1 para producir IFN γ , las mismas células mantienen la capacidad para producir células Th1 y no fallan en la producción de citocinas Th2.

Ejemplo 7. La expresión de T-bet no es afectada por la IL-21

T-bet es un factor de transcripción identificado recientemente que se expresa específicamente en las células Th1 diferenciadoras y que es capaz también de inducir de manera potente el IFN γ . Para determinar si el tratamiento con IL-21 de las células Th1 diferenciadoras afecta la inducción de la expresión de T-bet en las células Th, las células Thp se cultivaron bajo condiciones sesgadas para Th1 o Th2. Los extractos de proteína se recolectaron al inicio (cándidos) y 48 horas después del cultivo (Th1 y Th2). La expresión de T-bet y de actina se determinó mediante transferencia western.

Los resultado se muestran en la Figura 4A. Los sobrenadantes de IL-21 o simulados se incluyeron en los cultivos indicados. Como se esperó, la expresión de T-bet se indujo en los cultivos de Th1 y permaneció baja, bajo condiciones para Th2. La adición de la IL-21 no tuvo efecto en la expresión de T-bet en las células Th1. Este resultado indica que la expresión mediada por IL-21 de la expresión del IFN γ no es un resultado de una expresión reducida de T-bet.

Ejemplo 8. La IL-21 inhibe la señalización de la IL-12.

Se reporta que la señalización de la IL-12 juega un papel importante en el desarrollo de las células Th1.

Las células Th que carecen de IL-12R están severamente comprometidas en su capacidad para producir IFN γ (Wu, C., et al., J Immunol 159: 1658-65, 1997). Además, la expresión de la cadena de IL-12R β 2 está extinta
5 específicamente en las células Th2 en desarrollo, un efecto mediado por la IL-4 (Szabo, S. J., et al., J Exp Med 185: 817-24, 1997). Con el fin de determinar si la IL-21, como la IL-4, afecta la expresión de la cadena de IL-12 β 2 en las células Th1, el ARN de las células Thp sin desafiar,
10 cultivadas bajo condiciones sesgadas para Th1 y Th2, en la presencia y ausencia de IL-21, se analizó para la expresión de la 12R β 2 mediante PCR RealTime. Las células Thp se cultivaron bajo condiciones sesgadas para Th1 o Th2 durante una semana. Se incluyeron sobrenadantes de IL-21 o
15 simulados en los cultivos indicados. El ARN se recolectó 24 horas después de la estimulación secundaria con anti-CD3 y se valoraron para la expresión del IL-12R β 2 mediante PCR RealTime PCR.

Los resultados se muestran en la Figura 4B. Los
20 resultados son representativos de tres experimentos independientes. Como se esperaba, la expresión del IL-12R β 2 fue alta en las células Th1 cuando se compara con las células Th2. Sin embargo, la adición de IL-21 a los cultivos de Th1 no afecta la expresión del L-12R β 2. Por lo
25 tanto, a diferencia de los resultados reportados para la IL-4, la IL-21 no causa una expresión disminuida de IL-12 β 2. Además, la alta expresión de IL-12R β 2 junto con

120

altos niveles de TNF α e IL-2, sugiere que las células Th1 tratadas con IL-21 mantienen muchas características de Th1 con la excepción distintiva de una producción disminuida de IFN γ .

5 La Stat4 es activada específicamente por la IL-12 y se reporta que es un mediador crítico para la generación de las células Th1 que producen IFN γ (Wurster, A. L., et al., Oncogene 19: 2577-84, 2000). Con el fin de determinar si la IL-21 afecta la capacidad de la IL-12 para activar la
10 STAT-4, las células Thp sin desafiar se activaron durante 48 horas en la presencia o ausencia de la IL-21. Las células se estimularon posteriormente con IL-12, y el grado de fosforilación de la Stat4 se determinó mediante análisis western. Las células Thp se estimularon con anti-CD3
15 durante 48 horas, en la presencia de sobrenadantes de IL-21 o simulados. Los extractos de proteína se valoraron para la Stat4 fosforilada (p-Stat4), Stat4 y Stat1 mediante transferencia western. Los resultados son representativos de cuatro experimentos independientes.

20 Los resultados se muestran en la Figura 4C. Aunque se encontró que las células tratadas con IL-21 expresan niveles normales de IL-12R β 2, la fosforilación de la Stat4 en respuesta a la estimulación con IL-12 se redujo en las células tratadas con IL-21. Los niveles disminuidos
25 de la Stat4 fosforilada también se reflejan por una disminución en los niveles totales de la proteína Stat4. Como una comparación, la proteína Stat1 no se afectó por el

tratamiento con IL-21.

También se examinaron los niveles de ARN de la Stat4. Las células Thp se cultivaron como se describe para la Figura 4C, después de lo cual, el ARN se recolectó y se valoró para la expresión de la Stat4 por duplicado, mediante PCR RealTime.

Los resultados se muestran en la Figura 4D. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. Se detectaron niveles menores que los niveles de ARN de la Stat4. La disminución inducida por la IL-21 en los niveles de la proteína Stat4 probablemente se debe a una disminución en el ARNm de la Stat4. Estas conclusiones sugieren que la IL-21 dificulta la capacidad de respuesta de las células Th1 en desarrollo a la IL-12, a través de una reducción de la expresión del gen de la Stat4.

Ejemplo 9. La señalización de la IL-21 se requiere para limitar una respuesta de Th1 in vivo.

Para determinar si la IL-21 producida de manera endógena juega un papel en limitar la función de la célula Th1 in vivo, se examinó el grado de la respuesta a la hipersensibilidad del tipo retardado (DTH) en ratones deficientes en IL-21R. La DTH es una respuesta inflamatoria clásica mediada por las células Th1. Se generaron ratones deficientes en IL-21R cruzados nuevamente con la base C57BL/6, como se describe en Kasian et al.,

122

Immunity 16: 559-60, 2002. Ratones machos de ocho semanas de edad, se inmunizaron subcutáneamente con 100 mg de TNP-KLH (2,4,6-trinitrofenilo-hemocianina de lapa calada; Biosearch Technologies, Novato, CA) emulsificados en DFA, en la base de la cola. Después de seis días, los ratones se desafiaron con 50 µg de TNP-KLH en una almohadilla de la pata trasera y PBS en la almohadilla de la pata trasera contralateral. El espesor de la almohadilla de la pata se midió 24 horas después del desafío.

Los resultados se presentan en la Figura 5A. La hinchazón específica de la almohadilla de la pata de los ratones del tipo silvestre y deficientes en IL-21R (IL-21R-/-) se determinó sustrayendo la hinchazón no específica de la almohadilla de la pata inyectada con PBS de la hinchazón inducida por TNP-KLH. Cada punto de datos represente un ratón. Las líneas horizontales indican los promedios. Los resultados reflejan la reunión de los datos de dos experimentos independientes. Los resultados demuestran que los animales del tipo silvestre responden al desafío antigénico con una hinchazón robusta de la almohadilla de la pata. De manera sorprendente, los ratones deficientes en IL-21R montaron una respuesta DTH mucho más fuerte, resultando en un promedio del doble de la hinchazón.

La producción de IFNγ también se examinó en los ratones inmunizados. Los resultados se muestran en la Figura 5B. Las células T CD4+ de los nódulos linfáticos

drenantes de los ratones inmunizados, se estimularon *in vitro* con 250 mg/ml de TNP-KLH. Los sobrenadantes se analizaron para los niveles de IFN γ mediante ELISA. Los resultados mostrados son el promedio de los datos de dos
5 ratones de cada genotipo realizado por duplicado. La respuesta DTH incrementada en los animales deficientes en IL-21R se correlaciona con un marcado incremento en la producción de IFN γ de las células CD4+ purificada de los
nódulos linfáticos drenantes y reestimuladas por el
10 antígeno *in vitro*.

Estos resultados demuestran que la IL-21 está involucrada en la limitación de las respuestas de las células TH1, suprimiendo la producción del IFN γ .

Las modalidades adicionales están dentro de las
15 reivindicaciones.

REIVINDICACIONES:

1. Un método para inhibir los niveles de interferón gamma (IFN γ) en una célula o población de células T, que comprende:

5 poner en contacto la célula o población de células T con un agonista de la IL-21 en una cantidad suficiente para inhibir el IFN γ en la célula o población de células T, en donde el agonista es un polipéptido de IL-21 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85%
10 idéntica a la SEQ ID NO: 2, y que es capaz de unirse a un IL-21R.

2. El método según la reivindicación 1, que comprende además identificar una célula o población de células T en la cual se desea la inhibición de los niveles
15 de IFN γ .

3. Un método para promover la diferenciación de una célula o población de células precursoras de una célula Th (Thp) en una célula o población de células Th2, que comprende:

20 poner en contacto la célula o población de células Thp con un agonista de la IL-21 en una cantidad suficiente para inducir la diferenciación de la célula o población de células Thp, en donde el agonista es un polipéptido de IL-21 que comprende una secuencia de
25 aminoácidos al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 2, y que es capaz de unirse a una IL-21R.

4. El método según la reivindicación 3, que

comprende además identificar una célula o población de células Thp, en la cual se desea la diferenciación en la célula o población de células Th2.

5. Un método para inhibir la diferenciación de una célula o población de células Thp en una célula o población de células Th1, que comprende:

poner en contacto la célula o población de células Thp con un agonista de la IL-21 en una cantidad suficiente para inhibir la diferenciación de la célula o población de células Thp en la célula o población de células Th1, en donde el agonista es un polipéptido de IL-21 que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a la SEQ ID NO: 2, y que es capaz de unirse a un IL-21R.

6. El método según la reivindicación 5, que comprende además identificar una población de células T en la cual se desea la inhibición de la diferenciación de la célula o población de células Thp en una célula o población de células Th1.

7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 ó 5, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 ó 5, en donde el paso de poner en contacto se lleva a cabo *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*.

9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 ó 5, en donde el paso de poner en

contacto se lleva a cabo en un sujeto mamífero.

10. El método según la reivindicación 9, en donde el sujeto mamífero es un humano.

11. Un método para inhibir la diferenciación de una célula o población de células precursoras de Th (Thp) en una célula o población de células Th2, que comprende:

poner en contacto la célula o población de células Thp con un antagonista de una interleucina-21 (IL-21)/receptor de la IL-21 (IL-21R) en una cantidad suficiente para inhibir la diferenciación de la célula o población de células Thp en la población de células Th2, en donde el antagonista se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo anti-IL21R, un fragmento que se une al antígeno de un anticuerpo anti-IL21R y un fragmento soluble de un IL-21R.

12. El método según la reivindicación 11, que comprende además identificar una célula o población de células T, en la cual se desea una inhibición de la diferenciación de la célula o población de células Thp en una célula o población de células Th2.

13. Un método para incrementar los niveles de interferón gamma (IFN γ) en una célula o población de células T, que comprende:

poner en contacto la célula o población de células T con un antagonista de IL-21/IL-21R en una cantidad suficiente para incrementar los niveles de IFN γ en la célula o población de células T, en donde el antagonista

27

127

se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo anti-IL21R, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo anti-IL21 R y un fragmento soluble de un IL-21R.

14. El método según la reivindicación 13, que
5 comprende además identificar una población de células T en las cuales se desea un incremento en los niveles de IFN γ .

15. El método según la reivindicación 11 ó 13, en donde el fragmento soluble de un IL-21R, comprende una región extracelular de un Receptor de IL-21.

10 16. El método según la reivindicación 15, en donde el fragmento soluble comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85% idéntica a los aminoácidos 20 a 235 de la SEQ ID NO:4, y que es capaz de unirse a la IL-21.

15 17. El método según la reivindicación 15, en donde el fragmento soluble comprende los aminoácidos 1 a 235 de la SEQ ID NO:4.

18. El método según la reivindicación 15, en donde el fragmento soluble comprende además una fragmento Fc.

20 19. El método según la reivindicación 11 ó 13, en donde el antagonista es un anticuerpo anti-IL21R o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

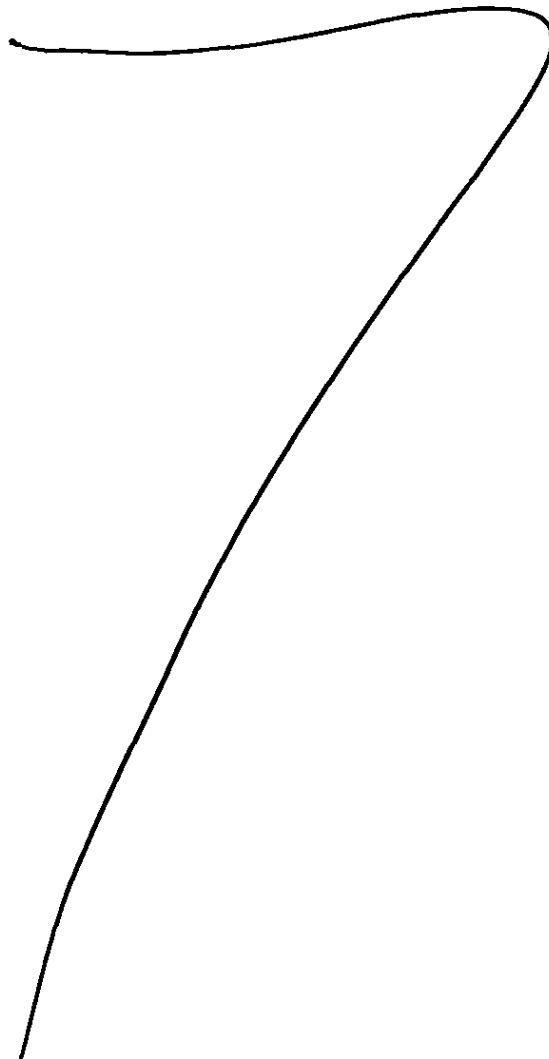
20. El método según la reivindicación 12, en donde la población de células T comprende al menos una
25 célula Th1.

21. El método según la reivindicación 11 ó 13, en donde el paso de poner en contacto se lleva a cabo ex

vivo, in vitro o in vivo.

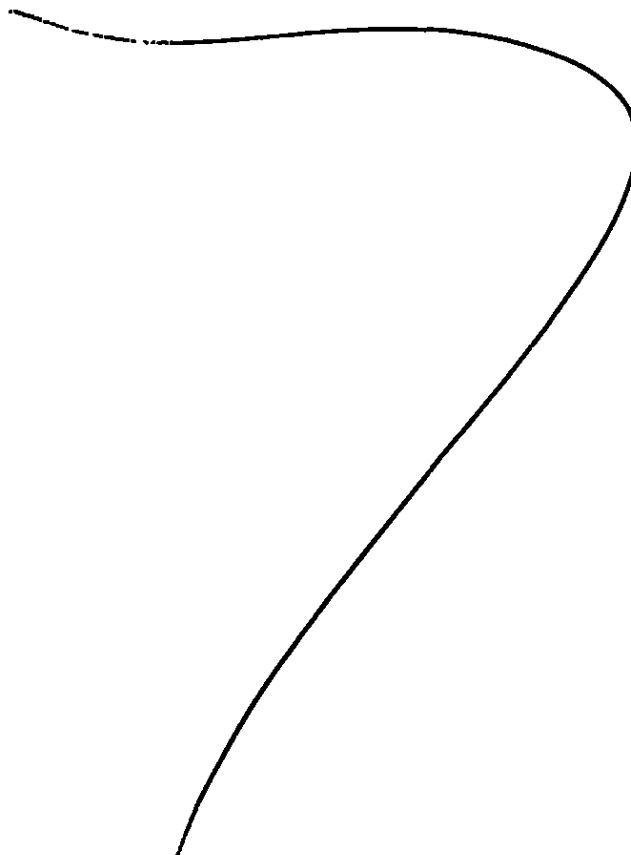
22. El método según la reivindicación 21, en donde el paso de poner en contacto se lleva a cabo en un sujeto mamífero.

5 23. El método según la reivindicación 22, en donde el sujeto mamífero es un humano.



RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Métodos y composiciones para modular el desarrollo y la función de las células T helper (Th), utilizando moduladores de la IL-21, por ejemplo, la actividad o el nivel de la IL-21 humana.



PCT

To:

IVOR R. ELRIFI
MINTZ, LEVIN, COHN, FERRIS, GLOVSKY AND
POPEO, PC.
ONE FINANCIAL CENTER
BOSTON, MASSACHUSETTS 02111

NOTIFICATION OF RECEIPT
OF DEMAND BY COMPETENT INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

(PCT Rules 59.3(e) and 61.1(b), first sentence
and Administrative Instructions, Section 601(a))

Date of mailing
(day/month/year)

22 OCT 2004

Applicant's or agent's file reference

22058-585PRO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US03/21975

International filing date (day/month/year)

15 Jul 2003

Priority date (day/month/year)

15 Jul 2002

Applicant

WYETH

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority considers the following date as the date of receipt of the demand for international preliminary examination of the international application:

13 Feb 2004 ✓

2. That date of receipt is:

- ☒ the actual date of receipt of the demand by this Authority (Rule 61.1(b)).
☐ the actual date of receipt of the demand on behalf of this Authority (Rule 59.3(e)).
☐ the date on which this Authority has, in response to the invitation to correct defects in the demand (Form PCT/IPEA/404), received the required corrections.

3. ☐ **ATTENTION:** That date of receipt is AFTER the expiration of 19 months from the priority date. Consequently, the election(s) made in the demand does (do) not have the effect of postponing the entry into the national phase until 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)). Therefore, the acts for entry into the national phase must be performed within 20 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 22). For details, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

- ☐ (If applicable) This notification confirms the information given by telephone, facsimile transmission or in person on:

4. Only where paragraph 3 applies, a copy of this notification has been sent to the International Bureau.

Name and mailing address of the IPEA/

Mail Stop PCT, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 703-305-3230

Authorized officer

Stacy Duncan

Telephone No. (703) 205-3692

Form PCT/IPEA/402 (July 1998)

☒ Data Entry ☐ Docket Entry ☐ Docket Cross X ☐ Previously Entered ☐ No Docketing Fee	Date By PM
--	---------------

OCT 25 2004
MINTZ LEVIN, BOSTON
PATENT DOCKET DEPT.

PATENT COOPERATION TREATY

Direct
Wyeth
PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ELRIFI, Ivor, R.
Mintz, Levin, Cohn, Ferris,
Glovsky, and Popeo, P.
C.
One Financial Center
Boston, MA 02111
United States of America

131

Date of mailing (day/month/year) 15 September 2003 (15.09.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 22058-682P-585 PRO-UB	International application No. PCT/US03/21975

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

WYETH et al (for all designated States except US)

GRUSBY, Michael et al (for US)

International filing date : 15 July 2003 (15.07.03)
Priority date(s) claimed : 15 July 2002 (15.07.02)
12 August 2002 (12.08.02)

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 25 August 2003 (25.08.03)

List of designated Offices :

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

EP : AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GO, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,

EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,

LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM,

TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

	Done By
☐ Data Entry	
☐ Docket Entry	
☐ Docket Cross Off	
☐ Previously Entered	
☒ No Docketing Req.	<i>M</i>
☐ ELITE	
☐ Annulment	

RECEIVED

SEP 26 2003

MINTZ LEVIN, BOSTON
PATENT DOCKET DEPT.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.88.75	Authorized officer: Hortensia SANTIAGO (Fax : 338 89 75) Telephone No. (41-22) 338 8588
--	---

Continuation of Form PCT/IB/301

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

132

Date of mailing (day/month/year) 15 September 2003 (15.09.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 22058-552P	International application No. PCT/US03/21975

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase - see updated important information (as of April 2002)
- ☒ confirmation of precautionary designations (if applicable)
- ☒ requirements regarding priority documents (if applicable)

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

24
33**INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE**

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated on the cover sheet of this Notification by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by Articles 22 and 39 and the applicable national laws. In addition, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date, not only in respect of any elected Office where a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 18 months from the priority date (see Article 39(1)), but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see PCT Gazette No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 18928, 18932 and 18934, as well as the PCT Newsletter, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the PCT Gazette ("Section IV" part published on a weekly basis), to the PCT Newsletter (on a monthly basis) and to the relevant National Chapters in Volume II of the PCT Applicant's Guide (the paper version of which is updated usually twice a year and the Internet version of which is updated usually on a weekly basis). Finally, a cumulative table of all applicable time limits for entering the national phase is available from WIPO's Internet site, via links from various pages the site including those of the Gazette, Newsletter and Guide, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in the PCT Applicant's Guide, Volume I/A, Chapter IX. Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date (this time limit may not be extended). If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. The Notice of confirmation and payment must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 18 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 18-month time limit (Rule 17.1(e)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 18-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within the time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 18-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

PCT

**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

ELRIFI, Ivor, R.
Mintz, Levin, Cohn, Ferris,
Glovsky, and Popeo, P.
C.
One Financial Center
Boston, MA 02111
United States of America

Date of mailing (day/month/year) 19 November 2003 (19.11.03)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 22058-552P	
International application No. PCT/US03/21975	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
International filing date (day/month/year) 15 July 2003 (15.07.03)	Priority date (day/month/year) 15 July 2002 (15.07.02)
Applicant WYETH et al.	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
15 July 2002 (15.07.02)	60/396,160	US	22 Augu 2003 (22.08.03)
12 Augu 2002 (12.08.02)	60/403,001	US	22 Augu 2003 (22.08.03)

☐ File Folder ☐ Data Entry ☐ Docket Entry ☒ Docket Cross Off ☐ Previously Entered ☐ No Docketing Req ☐ Order Copies ☐ Annulites	Done By  _____ _____ _____ _____ _____
---	---

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.89.75	Authorized officer Jérôme BRASIER Telephone No. (41-22) 338 8384
--	---

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

ELRIFI, Ivor, R.
Mintz, Levin, Cohn, Ferris, Glovsky, and Popeo P.C.
One Financial Center
Boston, MA 02111
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year)

22 January 2004 (22.01.2004)

Applicant's or agent's file reference

22058-585PRO

IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/US2003/021975

International filing date (day/month/year)

15 July 2003 (15.07.2003)

Priority date (day/month/year)

15 July 2002 (15.07.2002)

Applicant

WYETH et al

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:

AU, AZ, BY, CH, CN, CO, DE, DZ, EP, HU, JP, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, RU, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CR, CU, CZ, DK, DM, EA, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, KE, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PG, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 22 January 2004 (22.01.2004) under No. WO 2004/007682

4. TIME LIMITS for filing a demand for international preliminary examination and for entry into the national phase

The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date, but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

For filing a demand for international preliminary examination, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume IA, Chapter IX. Only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Gijsbertus Beijer - Carlos Roy

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Telephone No. (41-22) 338.91.11

SEQUENCE LISTING

<110> Wyeth
Grusby, Michael J
Wurster, Andrea
Young, Deborah
Collins, Mary
Whitters, Matthew

<120> Methods and Compositions for Modulating T Helper (TH)
Cell Development and Function

<130> 22058-585-061

<140> PCT/US03/21975
<141> 2003-07-15

<150> 60/396,160
<151> 2002-07-15

<150> 60/403,001
<151> 2002-08-12

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 617
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 1
gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtacttatga gatccagtc 60
tggcaacatg gagaggattg tcatctgtct gatggtcac ttcttgggga cactgggtcca 120
caaatcaagc tccaagggtc aagatcgcca catgattaga atgcgtcaac ttatagatat 180
tgttgatcag ctgaaaaatt atgtgaatga cttgggtccct gaatttctgc cagctccaga 240
agatgtagag acaaactgtg agtgggtcagc tttttcctgc tttcagaagg cccaactaaa 300
gtcagcaaat acaggaaaca atgaaaggat aatcaatgta tcaattaaaa agctgaagag 360
gaaaccacct tccacaaatg caggggagaag acagaaacac agactaacat gcccttcatt 420
tgattcttat gagaaaaaac caccacaaga attcctagaa agattcaaat cacttctcca 480
aaagatgatt catcagcatc tgtcctctag aacacacgga agtgaagatt cctgaggatc 540
taacttgcag ttggacacta tgttacatac tctaatatag tagtgaaagt catttctttg 600
tattccaagt ggaggag 617

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

<400> 2
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

192

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> 3
<211> 2887
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3

gaagcagcag	gtacccccctc	cacatcccta	gggctctgtg	atgtaggcag	aggcccgtgg	60
gagtcagcat	gccgcgtggc	tgggcgcgcc	ccttgctcct	gctgctgctc	cagggaggct	120
ggggctgccc	cgacctcgtc	tgctacaccg	attacctcca	gacggtcate	tgcatcctgg	180
aaatgtggaa	cctccacccc	agcacgctca	cccttacctg	gcaagaccag	tatgaagagc	240
tgaaggacga	ggccacctcc	tgacgcctcc	acaggctcgg	ccacaatgcc	acgcatgcca	300
cctacacctg	ccacatggat	gtattccact	tcatggccga	cgacattttc	agtgtcaaca	360
tcacagacca	gtctggcaac	tactcccagg	agtgtggcag	ctttctcctg	gctgagagca	420
tcaagccggc	tccccctttc	aacgtgactg	tgacctttct	aggacagtat	aatatctcct	480
ggcgctcaga	ttacgaagac	cctgccttct	acatgctgaa	gggcaagctt	cagtatgagc	540
tgcagtacag	gaaccgggga	gacccctggg	ctgtgagtcc	gaggagaaag	ctgatctcag	600
tggactcaag	aagtgtctcc	ctcctcccc	tggagttccg	caaagactcg	agctatgagc	660
tgcaggtgcg	ggcagggccc	atgcctggct	cctcctacca	ggggacctgg	agtgatgaga	720
gtgacccggg	catctttcag	acccagtcag	aggagttaaa	ggaaggctgg	aaccttcacc	780
tgctgcttct	cctcctgctt	gtcatagtct	tattcctgc	cttctggagc	ctgaagaccc	840
atccattgtg	gaggctatgg	aagaagatat	gggcctgcc	cagccctgag	cggttcttca	900
tgccccctgt	caagggctgc	agcggagact	tcaagaaatg	ggtgggtgca	cccttcactg	960
gctccagcct	ggagctggga	ccctggagcc	cagaggtgcc	ctccaccctg	gagggtgtaca	1020
gctgccaccc	accacggagc	ccggccaaga	ggctgcagct	cacggagcta	caagaaccag	1080
cagagctggg	ggagtctgac	ggtgtgccc	agcccagctt	ctggccgaca	gcccagaact	1140
cggggggctc	agcttacagt	gaggagaggg	atcggccata	cggcctgggt	tccattgaca	1200
cagtgactgt	gctagatgca	gaggggccat	gcacctggcc	ctgcagctgt	gaggatgacg	1260
gctacccagc	cctggacctg	gatgctggcc	tggagcccag	cccaggccta	gaggacccac	1320
tcttggatgc	agggaccaca	gtcctgtcct	gtggctgtgt	ctcagctggc	agccctgggc	1380
taggagggcc	cctgggaagc	ctcctggaca	gactaaagcc	accccttgca	gatggggagg	1440
actgggctgg	gggactgccc	tgggggtggc	ggtcacctgg	aggggtctca	gagagtgagg	1500
cgggctcacc	cctggccggc	ctggatatgg	acacgtttga	cagtggcttt	gtgggctctg	1560
actgcagcag	ccctgtggag	tgtgacttca	ccagccccgg	ggacgaagga	cccccccgga	1620
gctacctccg	ccagtgggtg	gtcattcctc	cgccactttc	gagccctgga	ccccaggcca	1680
gctaattgagg	ctgactggat	gtccagagct	ggccaggcca	ctgggcccctg	agccagagac	1740
aaggtcacct	gggctgtgat	gtgaagacac	ctgcagcctt	tggtctcctg	gatgggcctt	1800

tgagcctgat gtttacagtg tctgtgtgtg tgtgtgcata tgtgtgtgtg tgcataatgca 1860
tgtgtgtgtg tgtgtgtgtc ttaggtgctg agtggcatgt ccacgtgtgt gtgtgattgc 1920
acgtgcctgt gggcctggga taatgcccac ggtactccat gcattcacct gccctgtgca 1980
tgtctggact cacggagctc acccatgtgc acaagtgtgc acagtaaacg tgtttgtggt 2040
caacagatga caacagccgt cctccctect agggctctgt gttgcaagtt ggtccacagc 2100
atctccgggg ctttgtggga tcagggcatt gcctgtgact gagggcggagc ccagccctcc 2160
agcgtctgcc tccaggagct gcaagaagtc catattgttc cttatcacct gccaacagga 2220
agcgaaaggg gatggagtga gcccatggtg acctcgggaa tggcaatttt ttgggcggcc 2280
cctggacgaa ggtctgaatc ccgactctga taccttcttg ctgtgctacc tgagccaagt 2340
cgctccctct ctctgggcta gagtttctt atccagacag tggggaaggg atgacacacc 2400
tgggggaaat tggcgatgtc acccgtgtac ggtacgcagc ccagagcaga ccctcaataa 2460
acgtcagctt ccttctctt gcgccagag ccgaggcggg cgggggtgag aacatcaatc 2520
gtcagcgaca gcctgggcac ccgcgggggt gtccgcctg cagagggcca ctcggggggg 2580
tttccaggct taaaatcagt ccgtttctgc tcttggaac agctccccc caaccaagat 2640
ttctttttct aacttctgct actaagttt taaaaattcc ctttatgcac ccaagagata 2700
tttattaaac accaattacg tagcaggcca tggctcatgg gacccacccc ccgtggcact 2760
catggagggg gctgcagggt ggaactatgc agtgtgctcc ggccacacat cctgctgggc 2820
cccctacct gccccaattc aatcctgcca ataaatcctg tcttatttgt tcatcctgga 2880
gaattga 2887

<210> 4
<211> 538
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
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	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			
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				480
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> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 5
Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ser Pro Leu His Pro
1 5 10 15

<210> 6
<211> 224
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 6
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> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Primer

<400> 7
aagattcctg aggatccgag aag 23

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Primer

<400> 8
gcattcgtga gcgtctatag tgtc 24

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
Primer

<400> 9
ttcccaggga ctgaggagac gcc 23

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer		
<400> 10		
tttccatttt	tgcatcaagt tctc	24
<210> 11		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer		
<400> 11		
ccgatctaga	gtcagccgct	20
<210> 12		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer		
<400> 12		
aaacctgagc	ccaacgacaa	20
<210> 13		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Primer		
<400> 13		
agtgtccggt	tgcacccgtc	19

PATENT COOPERATION TREATY

1273

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
IVOR R. ELRIFI
MINTZ, LEVIN, COH, FERRIS, GLVSKY AND POPEO,
P.C.
ONE FINANCIAL CENTER
BOSTON, MA 02111

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference 22058-585PRO		Date of Mailing (day/month/year) 06 OCT 2004
International application No. PCT/US03/21975		International filing date (day/month/year) 15 July 2003 (15.07.2003)
Applicant WYETH		

1. ☐ The applicant is hereby notified that the international search report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90 bis.1 and 90 bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1430 Alexandria, Virginia 22313-1430 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Janet L. Anderson Telephone No. 703-308-0196
---	---

RECEIVED

Form PCT/ISA/220 (April 2002)

Done By

- ☐ Data Entry
☒ Docket Entry
☐ Docket Cross Off
☐ Previously Entered
☐ No Docketing Fee
☐ ELITE
☐ Annulites

OCT 08 2004

MINTZ LEVIN BOSTON
PATENT DOCKET DEPT.

(See notes on accompanying sheet)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 22058-585PRO	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US03/21975	International filing date (day/month/year) 15 July 2003 (15.07.2003)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 15 July 2002 (15.07.2002)
Applicant WYETH		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 2 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the Report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:



contained in the international application in written form.



filed together with the international application in computer readable form.



furnished subsequently to this Authority in written form.



furnished subsequently to this Authority in computer readable form.



the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.



the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box II).

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant.



because the applicant failed to suggest a figure.



because this figure better characterizes the invention.



None of the figures

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/21975

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 45/00

US CL : 424/85.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/85.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

STN, EAST: search terms IL-21, alpha11

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,307,024 (NOVAK et al.) 23 October 2001 (23.10.2001), column 33, lines 8-17, column 34, lines 11-35, column 64, lines 25-52, columns 193-195.	1-23
A	US 6,057,128 (DONALDSON et al.) 2 May 2000 (2.05.2000), column 8, lines 15-53.	1-23

☐

Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 September 2004 (20.09.2004)

Date of mailing of the international search report

06 OCT 2004

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

Janet L. Andres

Telephone No. 703-305-0156

746

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article," "Rule" and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How? Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

OCT 08 2014

MINTZ LEVIN, BOSTON
PATENT DOCKET DEPT.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under Article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

PATENT COOPERATION TREATY

147

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
IVOR R. ELRIFI
MINTZ, LEVIN, COH, FERRIS, GLVSKY AND POPEO,
P.C.
ONE FINANCIAL CENTER
BOSTON, MA 02111

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of Mailing (day/month/year)	
Applicant's or agent's file reference 22058-585PRO	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US03/21975	International filing date (day/month/year) 15 July 2003 (15.07.2003)
Applicant WYETH	

1. ☐ The applicant is hereby notified that the international search report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect is transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90 bis.1 and 90 bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1430
Alexandria, Virginia 22313-1430
Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

Jane E. Anderson

Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/ISA/220 (April 2002)

RECEIVED

OCT 08 2004

MINTZ LEVIN, BOSTON
PATENT DOCKET DEPT.

118

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL
TRAMITE

USUARIO RADICADOR

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

- | | | |
|---|-----|-----|
| - Indicación de que se solicita la concesión de una patente. | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. | () | () |
| - Descripción de la invención. | () | () |
| - Dibujos de ser estos pertinentes. | () | () |
| - Comprobante de Pago de las tasas establecidas. | () | () |

COMPLETA () INCOMPLETA () ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- | | | |
|--|-----|-----|
| - Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. | () | () |
| - Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño. | () | () |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas | () | () |

COMPLETA () INCOMPLETA () ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

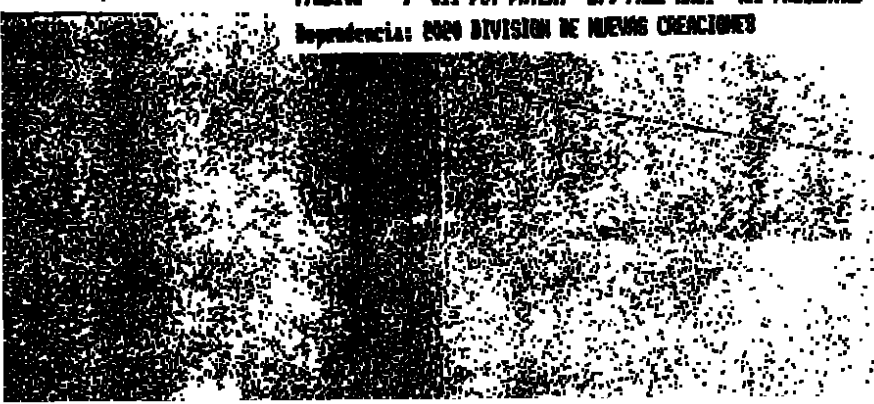
- | | | |
|--|-----|-----|
| - Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado. | () | () |
| - Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud. | () | () |
| - Representación gráfica del esquema de trazado | () | () |
| - Comprobante de pago de las tasas establecidas. | () | () |

COMPLETA () INCOMPLETA () ()

Firma Responsable:



Fecha: SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicacion : 05009447 00000000 Folios: 147
Fecha (UMB): 2005-02-03 16:24:56
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INICI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES





Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Folio 149

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor(a)
DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

Oficio N° 12297

ASUNTO:	Radicación N°	05-9447
	Solicitud internacional	PCT/US2003/021975
	Fecha inicio fase nacional	15/02/2005
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene los poderes debidamente otorgados, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
- La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente de los inventores a los solicitantes o a sus causantes. (Art. 26-k) Decisión 486/00.
- Si fuere el caso la solicitud debe contener la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional. (Art. 36.2.b) del tratado PCT).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista 250 8320
fecha, 04 MAR 2005

E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia

202027