



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

05-95726

54. TITULO

TRATAMIENTO DE DESORDEN INMUNOLOGICO USANDO AGONISTAS DE INTERLEUCINA-

21/RECEPTOR DE INTERLEUCINA-21

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K 38/20

A61P 37/00.

71. SOLICITANTE

WYETH

DOMICILIO

Madison, Estado de New Jersey, Estados Unidos de América.

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén.

22. BOGOTA, D.C.,

P. 145.

SS



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SEAL INDUSTRIAL Y COMERCIO
Caducación: 03/05/06 00000000 Folios: 191 acción
Fecha (PDI): 2005-09-21 17:18:34
Tramite : 011 PDI-MATEN: 378 FASE NML: 411 PRESENTAC:
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS OPERACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 21-10-05

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **WYETH**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Delaware, Estados Unidos de
América.

Dirección: Five Giralda Farms,
Madison, New Jersey 07940,
Estados Unidos de América

Domicilio: Madison, New Jersey, Estados
Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
APODERADO**

Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camyp.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual _____

Número 438.019 T.P. 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

1. **Mary COLLINS**
54 Rathburn Road,
Natick, Massachusetts 01760
Estados Unidos de América

3. **Mayra SENICES**
5 Holden Avenue,
Saugus, Massachusetts 01906
Estados Unidos de América

2. **Elaine CHIN**
2 Peabody Court,
Concord, Massachusetts 01742
Estados Unidos de América

4. **Deborah A YOUNG**
39 Nelson Road,
Melrose, Massachusetts 02176
Estados Unidos de América

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2004/008833

Fecha: 22 de Marzo de 2004

Publicación Internacional No. WO 2004/084835 A2

Fecha: 7 de Octubre de 2004

6

Título (54)

TRATAR DESORDEN INMUNOLOGICO USANDO AGONISTAS DE INTERLEUCINA-21/RECEPTOR DE INTERLEUCINA-21

7

Clasificación Internacional (51) A61K 38/10.

A61P 37/100.

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

21 de Marzo de 2003

(31) Número de Solicitud

60/456.920

9

Comprobante de pago No.: 05-89.906

Fecha: Septiembre 12 de 2005

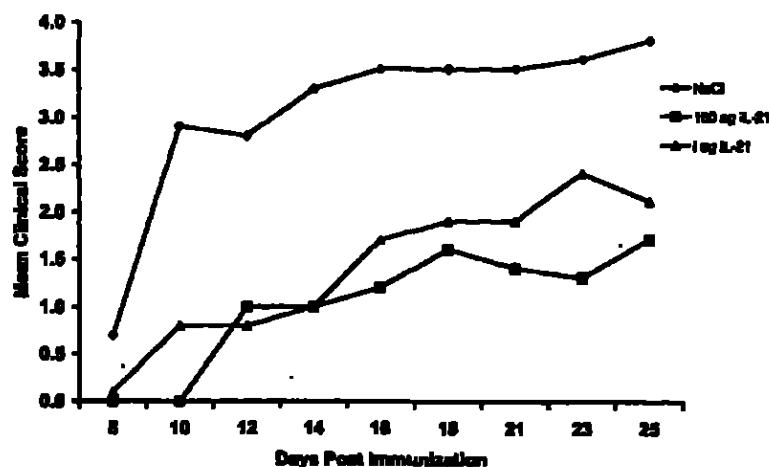
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 443.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Declaraciones. Cesión del inventor al solicitante bajo la regla 4.17 del PCT
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción 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 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERREROFIRMA: *Emilio Ferrero*
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

PRP

13665
8070

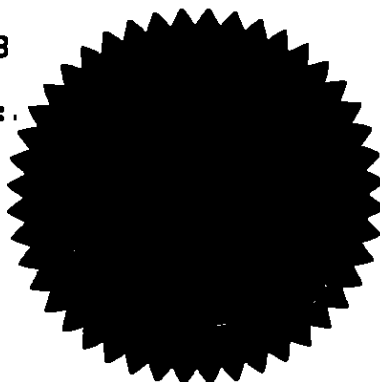
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

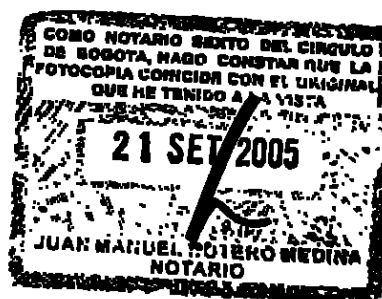
1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MARILYN L MITCHELL
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MARILYN L MITCHELL, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 26TH DAY OF JUNE 2003
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A175618
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



John E McCormac



Representación y Poder con autenticación notarial y Apostilla para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

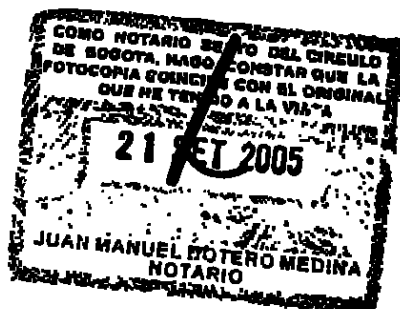
REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned
Wyeth

domiciliado (s) en/of **Five Giralda Farms**
Madison, NJ 07940, United States of America

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad de recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o al tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cuando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso. Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que mis (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejeren o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, concienzoso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, cancelación de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contenciosos administrativos relacionados con

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4a N° 72 35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the more that or his exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, injunctive, granting of licenses, the action for writs, nullity, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits



estos derechos; acciones y procesos que promuevan o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir los mandatos, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistír, apelar, recibir, recusar, y ratificar los autos de agencias oficiales.

5
instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Wyeth

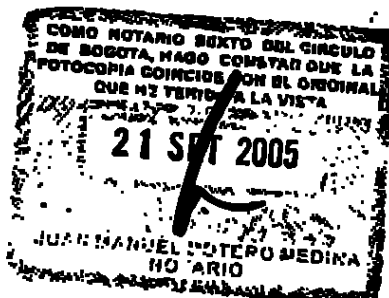
Dado y firmado hoy/Given and signed this 16th JUNE 2003

en/in Madison, New Jersey 07940; USA

por/by William H. Calnan

Assistant Secretary

Firma  Signature



CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

On this 16 day of June 2003
 before me, Notario Público o Funcionario Autorizado
 personally appeared _____
 whom I do know and to whom it is known to be the person(s) who executed the foregoing document, and who has(have) legal capacity to execute it.

Notario Público o Funcionario Autorizado - Notary Public or Acting Official

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

On this 16 day of June 2003
 appeared before me
William H. Calnan
 who I know personally and who signed this document as representative(s) of the Corporation/Company named
Wyeth

I certify:

Que he visto los siguientes documentos:
Certificado de Constitución Replanteado
presentado el 23 de Abril, 1988 ante el
Secretario del Estado de Delaware
 Que dichos documentos prueban lo siguiente:

1. Que Wyeth

una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente
 de acuerdo con las leyes del Delaware

2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es:
Five Giralda Farms, Madison, New Jersey
07940 United States of America

3. Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente
 Poder están comprendidos dentro del objeto social de la
 mencionada Sociedad/Compañía.

4. Que el(los) Sr.(s) William H. Calnan
 es(son) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Lugar Morristown

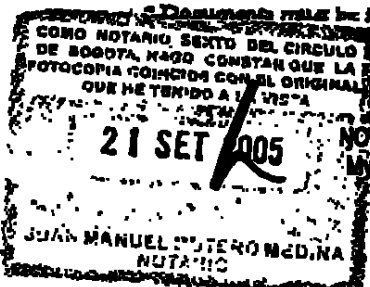
Estado New Jersey

on 16 de junio de 2003

Notario Público o Funcionario Autorizado - Notary Public or Acting Official

Los documentos deben identificarse con fecha y origen

CAVELIER ABOGADOS
 PPOB01-181 (CONUTA N°12-1-1.3.6 USA)



MARILYN L. MITCHELL
 NOTARY PUBLIC, STATE OF NEW JERSEY
 My Commission Expires February 8, 2005

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 16 day of June 2003
 before me, a Notary Public or Acting Official of _____
 personally appeared _____
 to me known, and known to me to be the person(s) who executed the foregoing document, and who has(have) legal capacity to execute it.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 16 day of June 2003
 appeared before me
William H. Calnan
 who I know personally and who signed this document as representative(s) of the Corporation/Company named
WYETH

I certify:

1. That I have seen the following document:
Restated Certificate of Incorporation filed
April 22, 1988 with Secretary of State of
Delaware

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Wyeth

is a Corporation/Company legally constituted and in existence
 in accordance with the laws Delaware

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is
Five Giralda Farms, Madison, New Jersey:
07940; United States of America

2.3. That the purpose or purposes for which the present Power
 of Attorney is granted are comprised within the corporation
 purposes set forth in the charter of the mentioned
 Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) William H. Calnan

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City Morristown

State New Jersey

This 16th day of June 2003

Marilyn L. Mitchell

2

TRADUCCIÓN OFICIAL 101/2003 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL APROBADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA Y MEDIANTE EL CUAL WYETH, EMPRESA DOMICILIADA EN FIVE GIRALDA FARMS, MADISON, NJ 07940 ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA OTORGA PODER A EMILIO FERRERO, TPA 31929, GONZALO PERDOMO, TPA 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ TPA 23555 Y A GERMÁN CAVELIER, TPA 832. EXPEDIDO Y FIRMADO EL 16 DE JUNIO DE 2003 EN MADISON, NEW JERSEY 07940, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. FIRMADO: WILLIAM H. CALNAN, SUBSECRETARIO.

CERTIFICADO NOTARIAL EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL DE FECHA 16 DE JUNIO DE 2003 POR EL CUAL SE CERTIFICA LA COMPARECENCIA DE WILLIAM H. CALNAN PARA FIRMAR EL PODER ARRIBA CITADO A NOMBRE DE WYETH Y PARA CERTIFICAR LA EXISTENCIA LEGAL, EL DOMICILIO DE DICHA EMPRESA Y LA CAPACIDAD DE WILLIAM H. CALNAN PARA COMPROMETER A DICHA FIRMA. FIRMADO: MARILYN L. MITCHELL. SELLO: MARILYN L. MITCHELL, NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE NUEVA JERSEY, MI CARGO VENCE EL 6 DE FEBRERO DE 2005.

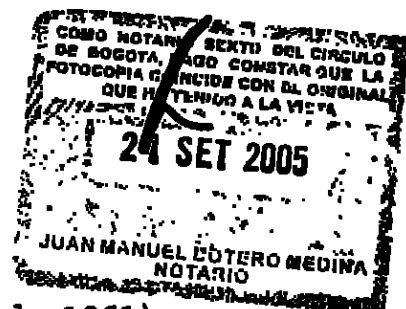
APOSTILLA:

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. Estados Unidos de América

Este documento público

2. ha sido firmado por MARILYN L. MITCHELL



3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY

4. lleva el sello de MARILYN L. MITCHELL, NOTARIO
CERTIFICADO

5. en TRENTON, NUEVA JERSEY

6. el 26 DE JUNIO DE 2003

7. por JOHN E. MCCORMAC, CONTADOR PÚBLICO AUTORIZADO, TESORERO
DE NUEVA JERSEY

8. Número A175618

9. Sello:

El sello del estado de Nueva Jersey

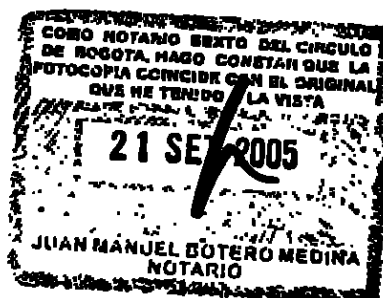
10. Firma: (ilegible)

COLO-13798-841-001-5

WPCL002G. ID. 4628

Bogotá, 12 de julio de 2003.

Eduardo Calado
Eduardo Calado Negrete
"TRADUCCIONES OFICIALES"
BIBLIOTECAS - ESPAÑOL - INGLÉS
Bos 541 Febrero de 1980



COLOMBIA
DEPARTAMENTO DE SANTANDER
MUNICIPIO DE SANTANDER (ES) P.
Eduardo Calado
Noguera
1.1 JUL. 2003



RECEBIÓ
2003 JUL 11 P 12:55
JEFE DE LA
SECRETARÍA DE

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
21 10 54
Cecilia Cordero

COMO NOTARIO SEXTO DEL CINGULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
21 SET 2005
MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ **Publicación Internacional WO 2004/084835 A2**

Descripción:

Páginas 61 en el idioma original

Páginas 89 en español

Reivindicaciones: Número (s) 49

Figuras: Número (s) 6

2. ☒ **Forma PCT/RO/101. PCT Request**
3. ☒ **Forma PCT/RO/106. Invitation to Correct Defects.**
4. ☐ **Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.**
5. ☐ **Forma PCT/ISA/220. Notificación De La Transmisión Del Informe De Búsqueda Internacional Y De La Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional, O De La Declaración.**
6. ☐ **Forma PCT/ISA/237. Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional.**
7. ☐ **Forma PCT/IB/304. Notification Concerning Submission Or Transmittal Of Priority Document.**
8. ☐ **Forma PCT/IB/306. Notification Of The Recoding Of A Change.**
Descripción De Modificación:

9. ☒ **Forma PCT/IB/308. Notice Informing The Applicant Of The Communication Of The International Application To The Designated Offices.**
10. ☐ **Forma PCT/IB/332. Information Concerning Elected Offices Notified Of Their Election.**
11. ☐ **FORMA PCT/IB/345. Communication in cases for which no other form is applicable.**

12. ☐ **Forma PCT/IPEA/401. PCT Demand**
13. ☐ **Forma PCT/IPEA/402. Notification Of Receipt Of Demand By Competent International Preliminary Examining Authority.**
14. ☐ **Forma PCT/IPEA/408. Written Opinion.**
15. ☐ **Forma PCT/IPEA/416. Notification Of Transmittal Of The International Preliminary Examination Report.**
16. ☐ **Forma PCT/IPEA/409. Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
17. ☐ **Traducción Al Español Del Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
18. ☐ **Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
19. ☒ **Extracto de publicación.**

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
7 October 2004 (07.10.2004)

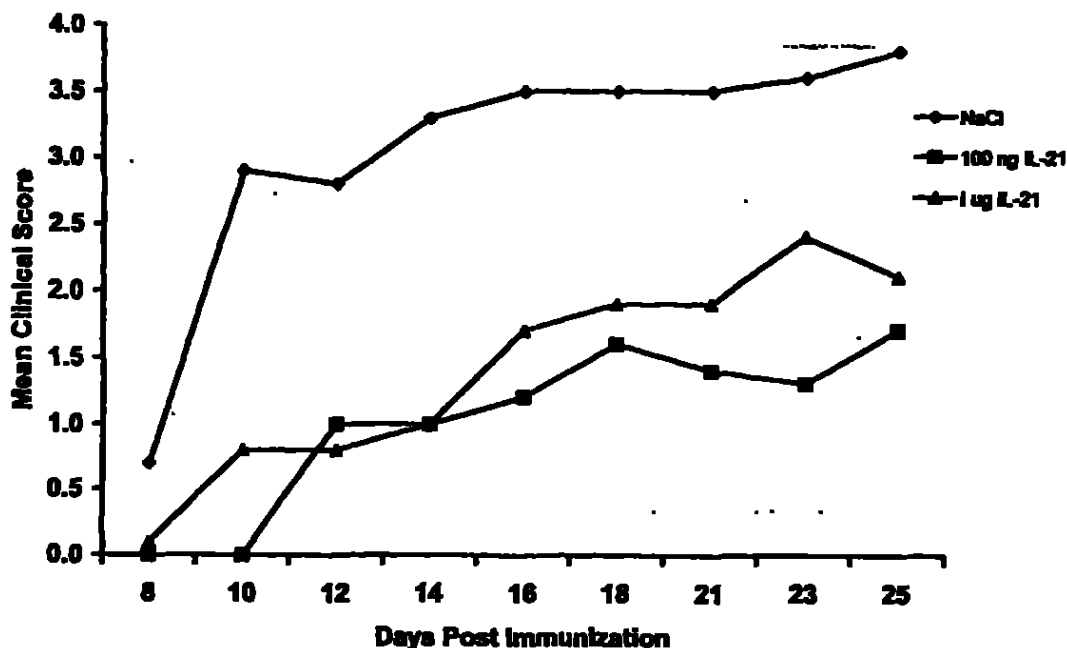
PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/084835 A2

- (51) International Patent Classification⁷: A61K (74) Agent: MYERS, Louis, Fish & Richardson P.C., 225 Franklin Street, Boston, MA 02110-2804 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US2004/008833 (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date: 22 March 2004 (22.03.2004)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60456,920 21 March 2003 (21.03.2003) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): WYETH [US/US]; 5 Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): COLLINS, Mary [US/US]; 54 Rathburn Road, Natick, MA 01760 (US). CHIN, Elaine, Y. [US/US]; 2 Peabody Court, Concord, MA 01742 (US). SENICES, Mayra [US/US]; 5 Holden Avenue, Saugus, MA 01906 (US). YOUNG, Deborah, A. [US/US]; 39 Nelson Road, Melrose, MA 02176 (US).
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: TREATING IMMUNOLOGICAL DISORDER USING AGONISTS OF INTERLEUKIN-21/ INTERLEUKIN-21 RECEPTOR



(57) Abstract: Methods and compositions for modulating interleukin-21 (IL-21)/IL-21 receptor (IL-21R or "MU-1"), are disclosed. IL-21/IL-21R agonists can be used by themselves or in combination with 5 anti-inflammatory agents to treat, e.g., ameliorate, symptoms associated with immunological disorders of the nervous system, e.g., multiple sclerosis.


Declarations under Rule 4.17:

- *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)*
- *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,*

EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, 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*

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.

**TREATING IMMUNOLOGICAL DISORDERS USING AGONISTS OF
INTERLEUKIN-21/ INTERLEUKIN-21 RECEPTOR**

5 **CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS**

This application claims priority to U.S. Application Serial No. 60/456,920, filed on March 21, 2003, the contents of which is hereby incorporated by reference in its entirety.

10 **FIELD OF THE INVENTION**

The present invention relates to methods and compositions for treating or preventing immunological disorders of the nervous system, e.g., multiple sclerosis, using IL-21/IL-21 receptor agonists, e.g., an IL-21 polypeptide or an active fragment thereof.

15

BACKGROUND OF THE INVENTION

Human IL-21 is a cytokine. In its mature form, it is about 131-amino acids in length and has sequence homology to IL-2, IL-4 and IL-15 (Parrish-Novak *et al.* (2000) *Nature* 408:57-63). Despite low sequence homology among interleukin cytokines, these cytokines share a common fold that includes a characteristic "four-helix-bundle" structure. Most cytokines bind to either class I or class II cytokine receptors. Class II cytokine receptors include the receptors for IL-10 and the interferons, whereas class I cytokine receptors include the receptors for IL-2, IL-7, IL-9, IL-11-13, and IL-15, as well as the hematopoietic growth factors, leptin and growth hormone (Cosman, D. (1993) *Cytokine* 5:95-106).

25

Human IL-21R is a class I cytokine receptor that is expressed by lymphoid cells, particularly by NK, B and T cells (Parrish-Novak *et al.* (2000) *supra*). Exemplary nucleic acid sequences encoding human interleukin-21 (IL-21) and its receptor (IL-21R) are described in WO 00/53761, WO 01/85792, Parrish-Novak *et al.* (2000) *supra*, and Ozaki *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:11439-11444, as are the corresponding amino acid sequences. IL-21R shows high sequence homology to IL-2

30

receptor β chain and IL-4 receptor α chain (Ozaki et al. (2000) *supra*). Upon ligand binding, IL-21R associates with the common gamma cytokine receptor chain (γ_c) that is shared by receptors for IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13 and IL-15 (Ozaki et al. (2000) *supra*; Asao et al. (2001) *J. Immunol.* 167:1-5). The widespread lymphoid distribution of IL-21R suggests that IL-21 may play a role in immune regulation. Indeed, *in vitro* studies have shown that IL-21 significantly modulates the function of B cells, CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and NK cells (Parrish-Novak et al. (2000) *supra*; Kasaian, M.T. et al. (2002) *Immunity.* 16:559-569). Parrish-Novak et al. (2000) suggested that IL-21 functions to activate or stimulate the proliferation and maturation of natural killer (NK) cells, the proliferation of mature B-cell populations co-stimulated with anti-CD40, and the proliferation of T cells co-stimulated with anti-CD3.

SUMMARY OF THE INVENTION

Methods and compositions for increasing the activity of, and/or an interaction between, an interleukin-21 (IL-21) and an IL-21 receptor (also referred to herein as "IL-21R" or "MU-1") using agonists of IL-21 or IL-21R are disclosed (also referred to herein as an "IL-21/IL-21R agonist" or "agonist"). Such methods and compositions can be used to modulate an immunological disorder of the nervous system or a disease or disorder associated with an IL-10 deficiency. For example, the methods and compositions can be used to treat or prevent multiple sclerosis (MS).

We have shown, for example, that treatment of mice prophylactically with an IL-21/IL-21R agonist, e.g., murine IL-21 polypeptide, results in an amelioration of symptoms in mouse models for experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

The modulation of EAE symptoms was detected in mouse models generated using myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptide (e.g., MOG 35-55) and proteolipid protein (PLP; e.g., PLP 139-151). IL-21 induced proliferation of T cells *in vitro*. Lymphocytes cultured in the presence of IL-21 produced increased amounts of IL-10 and decreased levels of interferon- γ (IFN- γ). Accordingly, agonists of IL-21/IL-21R activity can be used prophylactically or therapeutically to treat immunological disorders

of the nervous system (e.g., chronic immunological disorders of the nervous system, including multiple sclerosis).

Accordingly, in one aspect, the invention features a method of treating (e.g., curing, suppressing, ameliorating, reducing, or delaying) or preventing (e.g., preventing the onset of, or preventing recurrence or relapse of) an immunological disorder of the nervous system (e.g., a chronic immunological disorder of the nervous system, including multiple sclerosis), in a subject. The method includes: administering to the subject an IL-21/IL-21R agonist, in an amount sufficient to modulate immune cell activity and/or number (e.g., to modulate cytokine levels, e.g., cytokine expression, production and/or release), thereby treating or preventing the immunological disorder of the nervous system, e.g., multiple sclerosis. In one embodiment, the IL-21/IL-21R agonist is administered before the onset of symptoms to, e.g., delay or prevent the onset of, or prevent recurrence or relapse of, symptoms. For example, the IL-21/IL-21R agonist can be administered when a subject, e.g., an MS patient, is in remission. In other embodiment, the IL-21/IL-21R agonist is administered after the onset of symptoms or an attack. Exemplary general symptoms of MS include tremor, poor coordination, difficulty walking, and other problems.

The IL-21/IL-21R agonist can be administered to the subject, alone or in combination, with other therapeutic modalities as described herein. Preferably, the subject is a mammal, e.g., a human suffering from an immunological disorder of the nervous system, e.g., multiple sclerosis.

In one embodiment, the IL-21/IL-21R agonist interacts with, e.g., binds to, IL-21 or IL-21R, preferably, mammalian, e.g., human IL-21 or IL-21R, and increases or potentiates one or more IL-21 and/or IL-21R activities. An agonist of IL-21 is referred to herein as an "IL-21 agonist," and an agonist of IL-21R is referred to as a "IL-21R agonist." An IL-21 polypeptide is itself an IL-21R agonist. Preferred agonists bind to IL-21 or IL-21R with high affinity, e.g., with an affinity constant of at least about 10^7 M^{-1} , preferably about 10^8 M^{-1} , and more preferably, about 10^9 M^{-1} to 10^{10} M^{-1} or stronger. The IL-21/IL-21R agonist can be, e.g., an IL-21 polypeptide or an active fragment thereof, an IL-21 fusion protein, a peptide agonist, an antibody agonist or antigen-binding fragment thereof, or a small molecule agonist.

14

In one embodiment, the IL-21/IL-21R agonist is an IL-21 polypeptide, e.g., a human, bovine or murine 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 at least 85%, 90%, 95%, 98% or more identical thereto). In another embodiment, the IL-21/IL-21R agonist is a murine IL-21 polypeptide or an active fragment thereof (e.g., a murine IL-21 polypeptide comprising the amino acid sequence shown as SEQ ID NO:4, or encoded by a nucleotide sequence shown as SEQ ID NO:3, or a sequence at least 85%, 90%, 95%, 98% or more identical thereto). In yet other embodiments, the IL-21/IL-21R agonist is a fusion protein comprising an IL-21 polypeptide, e.g., human or murine IL-21 polypeptide, or a fragment thereof and, e.g., fused to, a second moiety, e.g., a polypeptide (e.g., a GST, Lex-A, MBP polypeptide sequence or an immunoglobulin chain, including, e.g., an Fc fragment, a heavy chain constant regions of the various isotypes, including: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, and IgE); an agonist antibody or antigen-binding fragment thereof, that binds to the IL-21 receptor; or a small molecule or peptide agonist. In other embodiments, the IL-21/IL-21R agonist is an agent that increases the activity or levels of IL-21 by, e.g., increasing expression, processing and/or secretion of functional IL-21. Nucleic acids encoding the aforesaid IL-21/IL-21R agonists can also be administered to the subject.

The fusion proteins may additionally include a linker sequence joining the first moiety, e.g., an IL-21 fragment, to the second moiety, e.g., an immunoglobulin fragment. In other embodiments, additional amino acid sequences can be added to the N- or C-terminus of the fusion protein to facilitate expression, steric flexibility, detection and/or isolation or purification.

The IL-21/IL-21R agonists described herein, e.g., IL-21 polypeptide or a fusion protein described herein, can be derivatized or linked to another functional molecule, e.g., another peptide or protein (e.g., an Fab' fragment). For example, the fusion protein or an antibody, or antigen-binding portion, can be functionally linked (e.g., by chemical coupling, genetic fusion, non-covalent association or otherwise) to one or more other molecular entities, such as an antibody (e.g., a bispecific or a multi-specific antibody), toxins, radioisotopes, cytotoxic or cytostatic agents, among others.

In another embodiment, the IL-21/IL-21R agonist is an antibody, e.g., an agonistic antibody, or antigen-binding fragment thereof, to IL-21R, preferably, human IL-21R. The antibody or antigen-binding fragment thereof, can be a humanized, chimeric, human (e.g., in vitro generated) antibody, or antigen-binding fragment thereof. In one embodiment, the antibody is a bispecific antibody, e.g., an antibody that interacts with IL-21R and another receptor chain.

In one embodiment, the method includes evaluating the subject for an IL-10 parameter. An "IL-10 parameter" is qualitative or quantitative information about IL-10 levels or activity, e.g., IL-10 mRNA or protein levels or activity. The information can include, for example, concentration of IL-10 in one more tissues or one or more samples from a subject. The subject can be evaluated, for example, before the administering, e.g., at least before administering a first dose. The subject can be evaluated, e.g., after the administering, e.g., at after administering one or more doses, e.g., at regular intervals, or in the case of continuous administration, after one or more intervals. The subject can be evaluated both before and after an administration. Information from evaluating an IL-10 parameter can be used to modulate administration of the IL-21/IL-21R agonist. For example, an increase in an IL-10 parameter to a value in the range of normal can indicate that a desired therapeutic effect. A decrease in an IL-10 parameter can indicate insufficient administration or non-responsiveness.

Similarly, it is possible to evaluate a corresponding IFN γ parameter. In such cases, a decrease in an IFN γ parameter to a value in the range of normal can indicate that a desired therapeutic effect. A increase in an IFN γ parameter can indicate insufficient administration or non-responsiveness. Still other parameters that can be evaluated related to other cytokines and factors provided in Table 3.

In one embodiment, the method includes evaluating the subject for a risk of an immunological disorder of the nervous system (e.g., of multiple sclerosis), or one or more symptoms of such a disorder. One method of evaluating risk includes evaluating an IL-10 parameter.

In one implementation, the IL-21/IL-21R agonist is administered in response to an alteration in status of a subject, e.g., in response to a flare-up or attack associated with MS.

16

The IL-21/IL-21R agonist(s) can be administered in the form of a single dose, or a series of doses separated by intervals of days, weeks or months. The IL-21/IL-21R agonist(s) can be administered by injection, e.g., by injection into the central nervous system, of a subject. For example, the IL-21/IL-21R agonist(s) can be injected into the lumbar cerebrospinal fluid (intrathecally). In other embodiments, the IL-21/IL-21R agonist(s) is administered intravenously.

In one embodiment, the IL-21/IL-21R agonists described herein, e.g., the pharmaceutical compositions thereof, are administered in combination therapy, i.e., combined with other agents, e.g., therapeutic agents, which are useful for treating or preventing an immunological disorder of the nervous system, e.g., multiple sclerosis. For example, the combination therapy can include one or more IL-21/IL-21R agonists, e.g., an IL-21 polypeptide or active fragment thereof, an IL-21 fusion protein, a peptide agonist, an antibody agonist, or a small molecule agonist) co-formulated with, and/or co-administered with, one or more additional therapeutic agents, e.g., one or more cytokine and growth factor inhibitors, immunosuppressants, anti-inflammatory agents, metabolic inhibitors, enzyme inhibitors, and/or cytotoxic or cytostatic agents, as described in more herein.

Examples of therapeutic agents that can be co-administered and/or co-formulated with one or more IL-21/IL-21R agonists to treat multiple sclerosis, include, but are not limited to, one or more of: interferon- β , for example, IFN β -1 α and IFN β -1 β ; a protein that simulates myelin basic protein (e.g., a synthetic protein, e.g., glatiramer acetate, COPAXONE[®]); corticosteroids; IL-1 inhibitors; TNF inhibitors; antibodies to CD40 ligand and CD80; antagonists of IL-12 and IL-23, e.g., antagonists of a p40 subunit of IL-12 and IL-23 (e.g., inhibitory antibodies against the p40 subunit); IL-22 antagonists; small molecule inhibitors, e.g., methotrexate, leflunomide, sirolimus (rapamycin) and analogs thereof, e.g., CCI-779; Cox-2 and cPLA2 inhibitors; NSAIDs; p38 inhibitors; TPL-2; M κ -2; NF κ B inhibitors; RAGE or soluble RAGE; P-selectin or PSGL-1 inhibitors (e.g., small molecule inhibitors, antibodies thereto, e.g., antibodies to P-selectin); estrogen receptor beta (ERB) agonists or ERB-NF κ B antagonists.

Examples of TNF inhibitors include, e.g., chimeric, humanized, effectively human, human or *in vitro* generated antibodies, or antigen-binding fragments thereof, that bind to TNF; soluble fragments of a TNF receptor, e.g., p55 or p75 human TNF

17

receptor or derivatives thereof, e.g., 75 kD TNFR-IgG (75 kD TNF receptor-IgG fusion protein, ENBREL™), p55 kD TNF receptor-IgG fusion protein; and TNF enzyme antagonists, e.g., TNF α converting enzyme (TACE) inhibitors.

Additional therapeutic agents that can be co-administered and/or co-formulated with one or more IL-21/IL-21R agonists include one or more of: interferon- β , for example, IFN β -1 α and IFN β -1 β ; COPAXONE®; corticosteroids; IL-1 inhibitors; TNF antagonists (e.g., a soluble fragment of a TNF receptor, e.g., p55 or p75 human TNF receptor or derivatives thereof, e.g., 75 kD TNFR-IgG (75 kD TNF receptor-IgG fusion protein, ENBREL™)); antibodies to CD40 ligand and CD80; and antagonists of IL-12 and/or IL-23, e.g., antagonists of a p40 subunit of IL-12 and IL-23 (e.g., inhibitory antibodies that bind to the p40 subunit of IL-12 and IL-23); methotrexate, leflunomide, and a sirolimus (rapamycin) or an analog thereof, e.g., CCI-779.

In another aspect, the invention features a method for modulating, e.g., increasing or decreasing, immune cell activity and/or number (e.g., the activity and/or number of an immune cell, e.g., a lymphocyte (e.g., a T cell) or a population of immune cells, e.g., a mixed or a substantially purified immune cell population. The method includes contacting an immune cell, e.g., an immune cell as described herein, with an IL-21/IL-21R agonist, e.g., an agonist as described herein, in an amount sufficient to modulate, e.g., increase or decrease, immune cell activity and/or number. In one embodiment, the activity includes modulation, e.g., increase or decrease, of cytokine activity or levels. For example, the IL-21/IL-21R agonist may increase lymphocytic production or levels of IL-10 and/or decrease production or levels of interferon- γ .

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/IL-21R agonist(s), e.g., an agonist as described herein, to the culture medium. Alternatively, the method can be performed on cells (e.g., immune cells as described herein) present in a subject, e.g., as part of an *in vivo* (e.g., therapeutic or prophylactic) protocol.

A change in immune cell activity includes any variation(s), e.g., increase/decrease, in one or more of: proliferation, cytokine secretion and/or production, survival, differentiation, cell responsiveness (e.g., desensitization), cytolytic

activity, effector cell activity, gene expression, among others, of the immune cell contacted with an IL-21/IL-21R agonist compared to a reference, e.g., an untreated immune cell. For example, contacting an immune cell with an IL-21/IL-21R agonist, e.g., an IL-21 polypeptide, can induce one or more of: proliferation, cytolytic activity, effector cell function, or cytokine secretion of one or more of: thymocytes, lymphocytes, lymph node T cells, mature CD4+ T cells, mature CD8+ T cells, or macrophages. In one embodiment, the IL-21/IL-21R agonist may increase lymphocytic production or levels of IL-10 and/or decrease production or levels of interferon- γ .

In another aspect, the invention features a method of modulating an IL-10 deficiency, or a disorder associated with an IL-10 deficiency in a mammalian subject. The method includes administering to the subject an interleukin-21 (IL-21) polypeptide in an amount sufficient to increase IL-10 expression or activity in the subject, e.g., at least 1.2, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 5, or 10 fold increase, e.g., between a 1.2-2.5 fold increase or between a 2.5-5 fold increase, a 5-10 fold increase, or a greater than 10 or 20 fold increase. An "IL-10 deficiency" is a statistically significant decrease in IL-10 relative to a corresponding normal subject. For example, the decrease can have a P value of less than 0.05. Since IL-21 or other IL-21/IL-21R agonists can be used to increase IL-10 levels or activity, IL-21 and such agonists can be used to modulate an IL-10 deficiency.

IL-10 levels can be monitored, for example, in blood, serum, or cerebrospinal fluid. Exemplary disorders that can be associated with an IL-10 deficiency include multiple sclerosis, significant inflammatory events (including ischemia-reperfusion injury), psoriasis and pemphigus. Since IL-21 can increase IL-10 levels, IL-21 can be used to treat at least one symptom of these disorders and others associated with an IL-10 deficiency.

In another aspect, the invention features a method of ameliorating multiple sclerosis in a mammalian subject, e.g., a human. The method includes administering to the subject an interleukin-21 (IL-21) polypeptide in an amount sufficient to ameliorate multiple sclerosis, or at least one symptom of multiple sclerosis in the subject. For example, where the subject is human, the IL-21 polypeptide can be a human IL-21 polypeptide, e.g., a polypeptide that includes SEQ ID NO:2, or an effectively human IL-21 polypeptide. For example, the polypeptide is recombinantly

19

produced, e.g., in a bacterial cell. In one embodiment, the method includes administering to the subject an interleukin-21 (IL-21) polypeptide in an amount sufficient to increase IL-10 expression or activity in the subject, e.g., at least 1.2, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 5, or 10 fold increase, e.g., between a 1.2-2.5 fold increase or between a 2.5-5 fold increase, a 5-10 fold increase, or a greater than 10 or 20 fold increase. The method can include other features described herein.

In another aspect, the invention features a method of treating or preventing an immunological disorder in a mammalian subject. The method includes evaluating an IL-10 parameter in a mammalian subject; and administering, to the subject, an interleukin-21 (IL-21) polypeptide in an amount that is dependent on results of the evaluated IL-10 parameter. For example, the IL-10 parameter includes qualitative or quantitative information about levels of IL-10 protein or IL-10 mRNA. In another example, the IL-10 parameter includes quantitative information about levels of IL-10 protein activity.

In one embodiment, the immunological disorder is a neurological disorder. For example, the subject is human and the immunological disorder is multiple sclerosis or a neurological disorder causes damage or alteration to myelin sheaths. The method can include other features described herein.

In another, the invention features a method of evaluating treatment of multiple sclerosis in a mammalian subject. The method includes: administering, to the subject, an agonist of an interleukin-21 (IL-21)/IL-21 receptor (IL-21R) (e.g., an IL-21 polypeptide, an agonistic anti-IL-21R antibody and an antigen-binding fragment of an agonistic anti-IL-21R antibody); and evaluating an IL-10 parameter in the subject. In one embodiment, the method further includes administering to the subject a second dose of the agonist, wherein the second dose is administered as a function of the evaluated IL-10 parameter.

In one embodiment, the subject is human, and the IL-21 polypeptide is a human IL-21 polypeptide, e.g., a polypeptide that includes SEQ ID NO:2.

In one embodiment, the second dose or any subsequent dose is tailored to deliver an interleukin-21 (IL-21) polypeptide in an amount sufficient to increase IL-10 expression or activity in the subject, e.g., at least 1.2, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 5, or 10 fold increase, e.g., between a 1.2-2.5 fold increase or between a 2.5-5 fold increase, a 5-10

fold increase, or a greater than 10 or 20 fold increase, e.g., relative to a baseline, e.g., prior to a first treatment. In a related method the first dose is so tailored. The method can include other features described herein.

In another aspect, the invention provides, compositions, e.g., pharmaceutical compositions, which include a pharmaceutically acceptable carrier and at least one of IL-21/IL-21R agonist as described herein (e.g., an IL-21 polypeptide or fusion protein described herein). In one embodiment, the compositions, e.g., pharmaceutical compositions, comprise a combination of two or more one of the aforesaid IL-21/IL-21R agonists. Combinations of the IL-21/IL-21R agonists and a drug, e.g., a therapeutic agent (e.g., one or more cytokine and growth factor inhibitors, immunosuppressants, anti-inflammatory agents, metabolic inhibitors, enzyme inhibitors, and/or cytotoxic or cytostatic agents, as described in more herein) are also within the scope of the invention.

In one embodiment, the pharmaceutical composition includes an IL-21/IL-21R agonist and at least one additional therapeutic agent, in a pharmaceutically-acceptable carrier. Examples of preferred additional therapeutic agents that can be co-formulated in a composition, e.g., a pharmaceutical composition, with one or more IL-21/IL-21R agonists, include, but are not limited to, one or more of: interferon- β , for example, IFN β -1 α and IFN β -1 β ; a protein that simulates myelin basic protein (e.g., COPAXONE®); corticosteroids; IL-1 inhibitors; TNF antagonists (e.g., a soluble fragment of a TNF receptor, e.g., p55 or p75 human TNF receptor or derivatives thereof, e.g., 75 kD TNFR-IgG (75 kD TNF receptor-IgG fusion protein, ENBREL™)); antibodies that bind to CD40 ligand and CD80; and antagonists of IL-12 and/or IL-23, e.g., antagonists of a p40 subunit of IL-12 and IL-23 (e.g., inhibitory antibodies against the p40 subunit); methotrexate, leflunomide, and a sirolimus (rapamycin) or an analog thereof, e.g., CCI-779.

In another aspect, the invention features an article of manufacture that includes (i) a container with one or more unit doses of a pharmaceutical composition comprising an IL-21 polypeptide; and (ii) instructions for administering the unit doses to a subject that has, or is suspected of having, multiple sclerosis. For example, the instructions are provided on a label. The label can be affixed to an external surface of the container. In one embodiment, the article further includes a second container, e.g., containing an

additional unit dose of a pharmaceutical composition comprising an IL-21 polypeptide.

In one embodiment, the article further includes a second container that includes a second pharmaceutical composition comprising an agent for treating multiple sclerosis, i.e., an agent other than IL-21. For example, the agent is glatiramer acetate or another agent described herein. In another embodiment, the pharmaceutical composition that includes an IL-21 polypeptide, in the first container, further includes a second agent agent for treating multiple sclerosis, e.g., glatiramer acetate.

The terms "MU-1" and "IL-21R" are used interchangeably herein. The terms "peptides," "polypeptides," and "proteins" are used interchangeably herein. A protein can include one or more chains.

Statistical significance can be determined by any art known method. Exemplary statistical tests include: the Students T-test, Mann Whitney U non-parametric test, and Wilcoxon non-parametric statistical test. Some statistically significant relationships have a P value of less than 0.05 or 0.02. Particular effects mediated by an IL-21/IL-21R agonist may show a difference that is statistically significant (e.g., P value < 0.05 or 0.02). The terms "induce", "inhibit", "potentiate", "elevate", "increase", "decrease" or the like, e.g., which denote distinguishable qualitative or quantitative differences between two states, and may refer to a difference, e.g., a statistically significant difference, between the two states.

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, controls 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

Figure 1A is a linear graph depicting the increased proliferation of lymph node cells cultured in the presence of 20 ng/ml of murine IL-21 at various dilutions. For example, at a 1:50 dilution, IL-21 caused increased proliferation of lymph node cells as compared to cells stimulated with peptide alone.

Figure 1B is a linear graph depicting the increased proliferation of T cells from proteolipid protein (PLP) transgenic mice cultured at the indicated concentration of murine IL-21 (ng/ml) and 1 µg/ml of PLP compared to cells treated with only 1 µg/ml of PLP. The graph shows that IL-21 induces proliferation of T cells from PLP transgenic mice.

Figure 2 is a bar graph depicting the increased secretion of IL-10 in the presence of the indicated concentrations of mouse IL-21 as compared to untreated cells. The response was saturable and at the highest tested concentration of IL-21 (25 ng/ml), cells produced approximately 2.5-fold more IL-10 than the control group. Production of increased levels of IL-10 suggests that IL-21 treatment can skew antigen-specific cells towards a Th2 profile.

Figure 3 is a bar graph showing a decrease in secretion of IFNγ by spleen cells and lymph node cells treated with the indicated concentrations of murine IL-21 compared to control cells. Addition of IL-21 to MOG 33-55-stimulated spleen cells from immunized mice results in a two-fold decrease of IFNγ, whereas addition of IL-21R causes a two-fold increase.

Figure 4 depicts a reduction in clinical symptoms of disease in an EAE model. The figure shows that IL-21 suppresses IFNγ and enhances IL-10. *Figure 4* is a linear graph showing the decrease in EAE symptoms detected in IL-21-treated PLP spleen cells compared to untreated cultures with respect to the days post *in vivo* transfer.

Figure 5 depicts a reduction in clinical symptoms of disease in an EAE model. It is a bar graph depicting a decrease in the severity of EAE in mice treated with either a low (100 ng/day) or high (1 µg /day) dose of murine IL-21 compared to control mice,

5 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Methods and compositions for modulating interleukin-21 (IL-21)/IL-21 receptor (MU-1) activity using agonists of IL-21 or IL-21 receptor ("IL-21R" or "MU-1"), are disclosed. In one embodiment, Applicants have shown that treatment of mice with an IL-21/IL-21R agonist, e.g., murine IL-21 polypeptide, results in an amelioration of
10 symptoms in mouse models for experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). The modulation of EAE symptoms was detected in mouse models generated using myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) peptide (e.g., MOG 35-55) and proteolipid protein (PLP). IL-21 induced proliferation of T cells *in vitro*. Lymphocytes cultured in the presence of IL-21 produced increased amounts of IL-10 and decreased levels of
15 interferon-γ. Accordingly, agonists of IL-21/IL-21R activity can be used to treat or prevent immunological disorders of the nervous system (e.g., chronic immunological disorders of the nervous system, including multiple sclerosis).

In order that the present invention may be more readily understood, certain terms are first defined. Additional definitions are set forth throughout the detailed
20 description.

The terms "interleukin-21", "IL-21" and "IL-21 polypeptide" refer to a protein (e.g., a mammalian, e.g., murine or human protein) which is capable of interacting with, e.g., binding to, IL-21R (e.g., a mammalian, e.g., murine or human protein) and having one of the following features: (i) an amino acid sequence of a naturally occurring
25 mammalian IL-21 or a fragment thereof, e.g., an amino acid sequence shown as SEQ ID NO:2 (human) or SEQ ID NO:4 (murine) or a fragment thereof; (ii) an amino acid sequence substantially homologous to, e.g., at least 85%, 90%, 95%, 98%, 99% homologous to, an amino acid sequence shown as SEQ ID NO:2 (human) or SEQ ID NO:4 (murine) or a fragment thereof; (iii) an amino acid sequence which is encoded by
30 a naturally occurring mammalian IL-21 nucleotide sequence or a fragment thereof (e.g., SEQ ID NO:1 (human) or SEQ ID NO:3 (murine), or a fragment thereof, e.g., a region encoding a mature form); (iv) an amino acid sequence encoded by a nucleotide

sequence which is substantially homologous to, e.g., at least 85%, 90%, 95%, 98%, 99% homologous to, a nucleotide sequence shown as SEQ ID NO:1 (human) or SEQ ID NO:3 (murine), or a fragment thereof (e.g., a region encoding a mature form); (v) an amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence degenerate to a naturally occurring IL-21 nucleotide sequence or a fragment thereof, e.g., SEQ ID NO:1 (human) or SEQ ID NO:3 (murine), or a fragment thereof (e.g., a region encoding a mature form); or (vi) an amino acid sequence, of at least 115 amino acids that is encoded by a nucleotide sequence that hybridizes to the complement of one of the foregoing nucleotide sequences under stringent conditions, e.g., highly stringent conditions (for example, the nucleotide sequence hybridizes in a region that encodes a mature IL-21 protein. IL-21 binding to IL-21R can lead to stat5 or stat3 signaling (Ozaki et al. (2000) *supra*). IL-21 polypeptide can be processed from a nascent protein that includes a signal sequence to a mature protein, from which the signal sequence has been removed.

An "effectively human" IL-21 polypeptide is an IL-21 polypeptide that includes a sufficient number of human amino acid positions such that the polypeptide does not elicit an immunogenic response in a normal human and so that the IL-21 polypeptide interacts with a human IL-21R.

The terms "MU-1," "MU-1 protein," "interleukin-21 receptor" or "IL-21R," refer to a receptor (e.g., of mammalian, e.g., murine or human origin) which is capable of interacting with, e.g., binding to, IL-21 (e.g., of mammalian, e.g., murine or human IL-21) and having one of the following features: (i) an amino acid sequence of a naturally occurring mammalian MU-1 polypeptide IL-21R/MU-1 or a fragment thereof, e.g., an amino acid sequence shown as SEQ ID NO:6 (human) or SEQ ID NO:8 (murine) or a fragment thereof (e.g., the mature region); (ii) an amino acid sequence substantially homologous to, e.g., at least 85%, 90%, 95%, 98%, 99% homologous to, an amino acid sequence shown as SEQ ID NO:6 (human) or SEQ ID NO:8 (murine) or a fragment thereof (e.g., the mature region); (iii) an amino acid sequence which is encoded by a naturally occurring mammalian IL-21R/MU-1 nucleotide sequence (e.g., SEQ ID NO:5 (human) or SEQ ID NO:7 (murine)) or a fragment thereof (e.g., the mature region); (iv) an amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence which is substantially homologous to, e.g., at least 85%, 90%, 95%, 98%, 99% homologous to, a nucleotide sequence shown as SEQ ID NO:5 (human) or SEQ ID NO:7 (murine) or a

25

fragment thereof (e.g., the mature region); (v) an amino acid sequence encoded by a nucleotide sequence degenerate to a naturally occurring IL-21R/MU-1 nucleotide sequence or a fragment thereof, e.g., SEQ ID NO:5 (human) or SEQ ID NO:7 (murine) or a fragment thereof (e.g., the mature region); or (vi) an amino acid sequence, of at least 450 amino acids that is encoded a nucleotide sequence that hybridizes to one of the foregoing nucleotide sequence sequences under stringent conditions, e.g., highly stringent conditions. The mature region of the human IL-21R listed in SEQ ID NO:6 is from about amino acids 20-538.

An exemplary IL-21R/MU-1 cDNA was deposited with the American Type Culture Collection on Mar. 10, 1998, as accession number ATCC 98687.

IL-21R is a class I cytokine family receptor, also known as NLR (WO 01/85792; Parrish-Novak *et al.* (2000) *Nature* 408:57-63; Ozaki *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:11439-11444). IL-21R is homologous to the shared β chain of the IL-2 and IL-15 receptors, and IL-4 receptor α chain (Ozaki *et al.* (2000) *supra*). Upon ligand binding, IL-21R/MU-1 is capable of interacting with a common γ cytokine receptor chain (γ_c) (Asao *et al.* (2001) *J. Immunol.* 167:1-5), and inducing the phosphorylation of STAT1 and STAT3 (Asao *et al.* (2001) or STAT5 (Ozaki *et al.* (2000). IL-21R shows widespread lymphoid tissue distribution.

Forms of IL-21 proteins of less than full length can be used in the methods and compositions, described herein, provided that it retains the ability to bind to an IL-21R polypeptide. IL-21 proteins of less than full length can be produced by expressing a corresponding fragment of the polynucleotide encoding the full-length IL-21 protein in a host cell, or by expressing a polynucleotide encoding a modified protein (e.g., if one or more internal amino acids are removed). One form of IL-21 polypeptide that is less than full length is mature IL-21, e.g., an IL-21 of SEQ ID NO:2. Another form is a polypeptide that is shorter than a full-length, mature IL-21, e.g., less than 131, 130, 129, 128, or 125 amino acids, e.g., between 115 and 130 amino acids in length. For example, an IL-21 polypeptide derived from SEQ ID NO:2 can be missing the final eight amino acids, or a subset thereof, e.g., the IL-21 polypeptide comprises amino acids 1-122. The corresponding polynucleotide fragments can also be used in the methods and compositions of the present invention. Modified polynucleotides as described above may be made by standard molecular biology techniques, including

26

construction of appropriate desired deletion mutants, site-directed mutagenesis methods or by the polymerase chain reaction using appropriate oligonucleotide primers.

The phrase "a biological activity of" a MU-1 or IL-21R polypeptide refers to one or more of the biological activities of the corresponding mature MU-1 protein, including, but not limited to, (1) interacting with, e.g., binding to, an IL-21 polypeptide (e.g., a human IL-21 polypeptide); (2) associating with signal transduction molecules, e.g., γ c, jak1; (3) stimulating phosphorylation and/or activation of stat proteins, e.g., STAT5 and/or STAT3; and/or (4) modulating, e.g., stimulating or decreasing, proliferation, differentiation, effector cell function, cytolytic activity, cytokine secretion, and/or survival of immune cells, e.g., T cells (CD8+, CD4+ T cells), NK cells, B cells, macrophages and megakaryocytes).

As used herein, a "IL-21/IL-21R agonist" refers to an agent which potentiates, induces or otherwise enhances one or biological activities of an IL-21R/MU-1 polypeptide, e.g., a biological activity as described herein. For example, the agonist interacts with, e.g., binds to, an IL-21R/MU-1 polypeptide. In one embodiment, an agonist interacts with IL-21R and another receptor chain, e.g., the γ cytokine receptor chain. For example, the agonist crosslinks IL-21R and γ cytokine receptor chain.

As used herein, a "therapeutically effective amount" of an IL-21/IL-21R agonist refers to an amount of an agent which is effective, upon single or multiple dose administration to a subject, e.g., a human patient, at curing, reducing the severity of, ameliorating one or more symptoms of a disorder, e.g., a disorder as described herein, or in prolonging the survival of the subject beyond that expected in the absence of such treatment.

As used herein, "a prophylactically effective amount" of an IL-21/IL-21R agonist refers to an amount of an IL-21/IL-21R agonist which is effective, upon single- or multiple-dose administration to a subject, e.g., a human patient, in preventing or delaying the occurrence of the onset or recurrence of a disorder, e.g., a disorder as described herein.

The term "induce", "inhibit", "potentiate", "elevate", "increase", "decrease" or the like, e.g., which denote quantitative differences between two states, refer to at least statistically significant differences between the two states.

The term "in combination" in this context means that the agents are given substantially contemporaneously, either simultaneously or sequentially. If given sequentially, at the onset of administration of the second compound, the first of the two compounds is preferably still detectable at effective concentrations at the site of treatment.

As used herein, a "fusion protein" refers to a protein containing two or more operably associated, e.g., linked, moieties, e.g., protein moieties. Preferably, the moieties are covalently associated. The moieties can be directly associated, or connected via a spacer or linker.

Sequences similar or homologous (e.g., at least about 85% sequence identity) to the sequences disclosed herein are also part of this application. In some embodiment, the sequence identity can be about 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or higher. Alternatively, substantial identity exists when the nucleic acid segments will hybridize under selective hybridization conditions (e.g., highly stringent hybridization conditions), to the complement of the strand. The nucleic acids may be present in whole cells, in a cell lysate, or in a partially purified or substantially pure form.

Calculations of "homology" or "sequence identity" between two sequences (the terms are used interchangeably herein) are performed as follows. The sequences are aligned for optimal comparison purposes (e.g., gaps can be introduced in one or both of a first and a second amino acid or nucleic acid sequence for optimal alignment and non-homologous sequences can be disregarded for comparison purposes). In a preferred embodiment, the length of a reference sequence aligned for comparison purposes is at least 30%, preferably at least 40%, more preferably at least 50%, even more preferably at least 60%, and even more preferably at least 70%, 80%, 90%, 100% of the length of the reference sequence. The amino acid residues or nucleotides at corresponding amino acid positions or nucleotide positions are then compared. When a position in the first sequence is occupied by the same amino acid residue or nucleotide as the corresponding position in the second sequence, then the molecules are identical at that position (as used herein amino acid or nucleic acid "identity" is equivalent to amino acid or nucleic acid "homology"). The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences, taking into account the number

of gaps, and the length of each gap, which need to be introduced for optimal alignment of the two sequences.

The comparison of sequences and determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm. The comparison uses
5 the GAP program from the GCG software package (www.gcg.com) and parameters that include a Blossum 62 scoring matrix with a gap penalty of 12, a gap extend penalty of 4, and a frameshift gap penalty of 5.

As used herein, the term "hybridizes under stringent conditions" describes conditions for hybridization and washing. Stringent conditions are known to those
10 skilled in the art and can be found in *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Aqueous and nonaqueous methods are described in that reference and either can be used. A preferred, example of stringent hybridization conditions are hybridization in 6X sodium chloride/sodium citrate (SSC) at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 50°C.
15 Another example of stringent hybridization conditions are hybridization in 6X SSC at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 55°C. A further example of stringent hybridization conditions are hybridization in 6X SSC at about 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 60°C. Preferably, stringent hybridization conditions are hybridization in 6X SSC at about
20 45°C, followed by one or more washes in 0.2X SSC, 0.1% SDS at 65°C. Particularly preferred highly stringent conditions (and the conditions that should be used if the practitioner is uncertain about what conditions should be applied to determine if a molecule is within a hybridization limitation) are 0.5M sodium phosphate, 7% SDS at 65°C, followed by one or more washes at 0.2X SSC, 1% SDS at 65°C.

25 IL-21/IL-21R agonists may have additional conservative or non-essential amino acid substitutions, which do not have a substantial effect on their functions. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families
30 include amino acids with basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (e.g.,

alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine).

5 IL-21/IL-21R Agonists

The IL-21/IL-21R agonists used in the methods and compositions can be an IL-21 polypeptide, e.g., a human or murine 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 an amino acid sequence including a region encoded by a nucleotide
10 sequence shown as SEQ ID NO:1; or a sequence at least 85%, 90%, 95%, 98% or more identical thereto)(e.g., the region of SEQ ID NO:1 that encodes a mature IL-21 polypeptide. In another embodiment, the IL-21/IL-21R agonist is a murine IL-21 polypeptide or an active fragment thereof (e.g., a murine IL-21 polypeptide comprising the amino acid sequence shown as SEQ ID NO:4, or encoded by a nucleotide sequence
15 shown as SEQ ID NO:3, or a sequence at least 85%, 90%, 95%, 98% or more identical thereto), or an IL-21 polypeptide from another mammal, e.g., a non-human primate, a bovine, and so forth.

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
20 GENBANK® Acc. No. X_011082. An exemplary disclosed human IL-21 nucleotide sequence is presented below:

```

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

```

Additional nucleotide sequence information is available, e.g., from AF254069
35 [gi:11093535] which provides a 642 bp mRNA sequence encoding an exemplary IL-21 polypeptide. In some embodiments, it is sufficient to use the region of nucleotide sequence that encodes mature IL-21, e.g., without a region encoding a signal sequence.

30

The amino acid sequence of an exemplary mature human IL-21 polypeptide is presented below:

QDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANT
5 GNNERIINVSIIKKLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKM
IHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID NO:2)

The mature sequence is based on Parrish-Novak *et al.* (2000) *Nature* 408:57-63.

The full length sequence is:

10

MRSSPGNMERIVICLMVIFLGTLVHKSSSQGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIIKKLKRKPPSTNAGRRQ
KHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (SEQ ID
NO:10)

15

Additional entries providing amino acid sequences for human IL-21 polypeptides are as follows: gi|1141875|ref|NP_068575.1| interleukin 21 [*Homo sapiens*]; gi|11093536|gb|AAG29348.1| interleukin 21 [*Homo sapiens*]; gi|42542586|gb|AAH66259.1| Interleukin 21 [*Homo sapiens*];
20 gi|42542588|gb|AAH66260.1| Interleukin 21 [*Homo sapiens*];
gi|42542657|gb|AAH66261.1| Interleukin 21 [*Homo sapiens*];
gi|42542659|gb|AAH66258.1| Interleukin 21 [*Homo sapiens*]; and
gi|42542807|gb|AAH66262.1| Interleukin 21 [*Homo sapiens*]. The human IL-21 polypeptide can be a variant of a polypeptide described herein, provided that it retains
25 functionality.

IL-21 polypeptides can be encoded by nucleic acids that hybridize to the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:7, or the complement thereof, under a condition described herein, e.g., highly stringent conditions (for example, 0.1X SSC at 65°C). Isolated polynucleotides which
30 encode IL-21/IL-21R proteins or fusion proteins, but which differ from the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:7, by virtue of the degeneracy of the genetic code can be used. Variations in the nucleotide

sequence as set forth in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:7, which are caused by point mutations or by induced modifications can also be used.

In yet other embodiments, the IL-21/IL-21R agonist is a fusion protein comprising an IL-21 polypeptide, e.g., human or murine IL-21 polypeptide, or a
5 fragment thereof and, e.g., fused to, a second moiety, e.g., a polypeptide (e.g., a GST, Lex-A, MBP polypeptide sequence or an immunoglobulin chain, including, e.g., an Fc fragment, a heavy chain constant regions of the various isotypes, including: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, and IgE).

The fusion proteins may additionally include a linker sequence joining the IL-21
10 or IL-21R fragment to the second moiety. For example, the fusion protein can include a peptide linker, e.g., a peptide linker of about 4 to 20, more preferably, 5 to 10, amino acids in length; the peptide linker is 8 amino acids in length. Each of the amino acids in the peptide linker is selected from the group consisting of Gly, Ser, Asn, Thr and Ala; the peptide linker includes a Gly-Ser element. In other embodiments, the fusion protein
15 includes a peptide linker and the peptide linker includes a sequence having the formula (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly, SEQ ID NO:11), wherein y is, e.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, or 8.

In other embodiments, additional amino acid sequences can be added to the N- or C-terminus of the fusion protein to facilitate expression, detection and/or isolation or purification. For example, IL-21 fusion protein may be linked to one or more additional
20 moieties, e.g., GST, His6 tag, FLAG tag. For example, the fusion protein may additionally be linked to a GST fusion protein in which the fusion protein sequences are fused to the C-terminus of the GST (*i.e.*, glutathione S-transferase) sequences. Such fusion proteins can facilitate the purification of the fusion protein.

In another embodiment, the fusion protein includes a heterologous signal
25 sequence (*i.e.*, a polypeptide sequence that is not present in a polypeptide encoded by a IL-21 nucleic acid) at its N-terminus. For example, the native signal sequence can be removed and replaced with a signal sequence from another protein. In certain host cells (e.g., mammalian host cells), expression and/or secretion of IL-21/IL-21R agonist can be increased through use of a heterologous signal sequence. IL-21R proteins and
30 fragments thereof can also be produced using similar methods, e.g., to provide an immunogen to obtain agonizing antibodies that interact with IL-21R.

A chimeric or fusion protein 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/IL-21R agonist 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 fusion polypeptides can exist as oligomers, such as dimers (e.g., homo- or hetero-dimers) or trimers. The first polypeptide, and/or nucleic acids encoding the first polypeptide, can be constructed using methods known in the art.

In some embodiments, the first polypeptide includes full-length IL-21/IL-21R agonist polypeptide (e.g., IL-21 itself). Alternatively, the first polypeptide comprises less than full-length IL-21/IL-21R polypeptide. A signal peptide that can be included in the fusion protein is MPLLLLLLLLLPSPLHP (SEQ ID NO:9). If desired, one or more amino acids can additionally be inserted between the first polypeptide moiety comprising the IL-21/IL-21R agonist 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/IL-21R agonist polypeptide.

In preferred embodiments, the second polypeptide includes at least a region of an immunoglobulin polypeptide. Immunoglobulin fusion polypeptide 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 comprises less than full-length immunoglobulin polypeptide, *e.g.*, a heavy chain, light chain, Fab, Fab₂, Fv, or Fc. The second polypeptide can include the heavy chain of an immunoglobulin polypeptide. The second polypeptide can include the Fc region of an immunoglobulin polypeptide.

In some embodiments, the second polypeptide has less effector function than the effector function of an Fc region of a wild-type immunoglobulin heavy chain. Fc effector function includes for example, Fc receptor binding, complement fixation and T cell depleting activity (*see for example*, US Patent No. 6,136,310). Methods for 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.

The isolated IL-21/IL-21R agonist polynucleotides described herein may be operably linked to an expression control sequence such as the pMT2 or pED expression vectors disclosed in Kaufman et al., *Nucleic Acids Res.* 19, 4485-4490 (1991), in order to produce the protein recombinantly. Many suitable expression control sequences are known in the art. General methods of expressing recombinant proteins are also known and are exemplified in R. Kaufman, *Methods in Enzymology* 185, 537-566 (1990). As defined herein, "operably linked" means enzymatically or chemically ligated to form a covalent bond between a particular polynucleotide encoding a protein of interest and the expression control sequence, in such a way that the protein of interest (*e.g.*, IL-21 or another IL-21/IL-21R agonist) is expressed by a host cell which has been transformed (transfected) with the ligated polynucleotide/expression control sequence.

The term "vector", as used herein, is intended to refer to a nucleic acid molecule capable of transporting, or sustaining maintenance or replication of, another nucleic acid to which it has been linked. One type of vector is a "plasmid", which refers to a circular double stranded DNA loop into which additional DNA segments may be ligated. Another type of vector is a viral vector, wherein additional DNA segments may

be ligated into the viral genome. Certain vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). Other vectors (e.g., non-episomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon
5 introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as "recombinant expression vectors" (or simply, "expression vectors"). In general, expression vectors of utility in recombinant DNA techniques are often in the form of plasmids. In the present
10 specification, "plasmid" and "vector" may be used interchangeably as the plasmid is the most commonly used form of vector. However, the invention is intended to include such other forms of expression vectors, such as viral vectors (e.g., replication defective retroviruses, adenoviruses and adeno-associated viruses), which serve equivalent functions.

15 The term "regulatory sequence" is intended to include promoters, enhancers and other expression control elements (e.g., polyadenylation signals) that control the transcription or translation of the antibody chain genes. Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). It will be appreciated by
20 those skilled in the art that the design of the expression vector, including the selection of regulatory sequences may depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, etc. Preferred regulatory sequences for mammalian host cell expression include viral elements that direct high levels of protein expression in mammalian cells, such as promoters and/or enhancers
25 derived from FF-1a promoter and BGH poly A, cytomegalovirus (CMV) (such as the CMV promoter/enhancer), Simian Virus 40 (SV40) (such as the SV40 promoter/enhancer), adenovirus, (e.g., the adenovirus major late promoter (AdMLP)) and polyoma. For further description of viral regulatory elements, and sequences thereof, see e.g., U.S. Patent No. 5,168,062 by Stinski, U.S. Patent No. 4,510,245 by
30 Bell *et al.* and U.S. Patent No. 4,968,615 by Schaffner *et al.*

The recombinant expression vectors may carry additional sequences, such as sequences that regulate replication of the vector in host cells (e.g., origins of

35

replication) and selectable marker genes. The selectable marker gene facilitates selection of host cells into which the vector has been introduced (see e.g., U.S. Patents Nos. 4,399,216, 4,634,665 and 5,179,017, all by Axel *et al.*). For example, typically the selectable marker gene confers resistance to drugs, such as G418, hygromycin or methotrexate, on a host cell into which the vector has been introduced. Preferred selectable marker genes include the dihydrofolate reductase (DHFR) gene (for use in dhfr host cells with methotrexate selection/amplification) and the *neo*-gene (for G418 selection).

A number of types of cells may act as suitable host cells for expression of the IL-21/IL-21R agonist protein or fusion protein thereof. Any cell type capable of expressing functional IL-21/IL-21R protein may be used. Suitable mammalian host cells include, for example, monkey COS cells, Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, human kidney 293 cells, human epidermal A431 cells, human Colo205 cells, 3T3 cells, CV-1 cells, other transformed primate cell lines, normal diploid cells; cell strains derived from *in vitro* culture of primary tissue, primary explants, HeLa cells, mouse L cells, BHK, HL-60, U937, HaK, Rat2, BaF3, 32D, FDCP-1, PC12, M1x or C2C12 cells.

The IL-21/IL-21R agonist protein or fusion protein thereof may also be produced by operably linking a polynucleotide encoding such a protein to suitable control sequences in one or more insect expression vectors, and employing an insect expression system. Materials and methods for baculovirus/insect cell expression systems are commercially available in kit form from, e.g., Invitrogen, San Diego, Calif. U.S.A. (the MAXBAC® kit), and such methods are well known in the art, as described in Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), incorporated herein by reference. Soluble forms of the MU-1 protein may also be produced in insect cells using appropriate isolated polynucleotides as described above.

Alternatively, the IL-21/IL-21R agonist protein or fusion protein thereof may be produced in lower eukaryotes such as yeast or in prokaryotes such as bacteria. Suitable yeast strains include *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* strains, *Candida*, or any yeast strain capable of expressing heterologous proteins. Suitable bacterial strains include *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*,

Salmonella typhimurium, or any bacterial strain capable of expressing heterologous proteins.

In one embodiment, IL-21 is produced in a bacterial without a signal sequence (e.g., without either a prokaryotic or eukaryotic signal sequence). Expression in
5 bacteria may result in formation of inclusion bodies incorporating the recombinant protein. Thus, refolding of the recombinant protein may be required in order to produce active or more active material. Several methods for obtaining correctly folded heterologous proteins from bacterial inclusion bodies are known in the art. These methods generally involve solubilizing the protein from the inclusion bodies, then
10 denaturing the protein completely using a chaotropic agent.

When cysteine residues are present in the primary amino acid sequence of the protein, the protein can be refolded in an environment which facilitates correct formation of disulfide bonds (e.g., a redox system). General methods of refolding are disclosed in Kohno, Meth. Enzym., 185:187-195 (1990). EP 0433225 and U.S.
15 5,399,677. Asano et al. (2002) *FEBS Lett.* 528(1-3):70-6 describes an exemplary method for refolding IL-21 produced in bacterial cells. For example, rIL-21 (recombinant IL-21) is expressed as insoluble inclusion bodies in *E. coli*, then solubilized (e.g., using a denaturant) and refolded by using a modified dialysis method in which redox reagents are introduced.

20 The IL-21/IL-21R agonist protein or fusion protein thereof may also be expressed as a product of transgenic animals, e.g., as a component of the milk of transgenic cows, goats, pigs, or sheep which are characterized by somatic or germ cells containing a polynucleotide sequence encoding the IL-21/IL-21R agonist protein or fusion protein thereof.

25 The IL-21/IL-21R agonist protein or fusion protein thereof may be prepared by growing a culture transformed host cells under culture conditions necessary to express the desired protein. The resulting expressed protein may then be purified from the culture medium or cell extracts. Soluble forms of the IL-21/IL-21R agonist protein or fusion protein thereof can be purified from conditioned media. Membrane-bound forms
30 of MU-1 protein can be purified by preparing a total membrane fraction from the expressing cell and extracting the membranes with a non-ionic detergent such as Triton X-100.

The IL-21/IL-21R agonist protein or fusion protein can be purified using methods known to those skilled in the art. For example, the IL-21/IL-21R agonist protein can be concentrated using a commercially available protein concentration filter, for example, an AMICON® or MILLIPORE® PELLICON™ ultrafiltration unit.

- 5 Following the concentration step, the concentrate can be applied to a purification matrix such as a gel filtration medium. Alternatively, an anion exchange resin can be employed, for example, a matrix or substrate having pendant diethylaminoethyl (DEAE) or polyethyleimine (PEI) groups. The matrices can be acrylamide, agarose, dextran, cellulose or other types commonly employed in protein purification.
- 10 Alternatively, a cation exchange step can be employed. Suitable cation exchangers include various insoluble matrices comprising sulfopropyl or carboxymethyl groups. Sulfopropyl groups are preferred (e.g., S-Sepharose® columns). The purification of the MU-1 protein or fusion protein from culture supernatant may also include one or more column steps over such affinity resins as concanavalin A-agarose, heparin-
- 15 TOYOPEARL® or Cibacrom blue 3GA SEPHAROSE®; or by hydrophobic interaction chromatography using such resins as phenyl ether, butyl ether, or propyl ether; or by immunoaffinity chromatography. Finally, one or more reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) steps employing hydrophobic RP-HPLC media, e.g., silica gel having pendant methyl or other aliphatic groups, can be employed to
- 20 further purify the IL-21/IL-21R agonist protein. Affinity columns including antibodies to the IL-21/IL-21R agonist protein can also be used in purification in accordance with known methods. Some or all of the foregoing purification steps, in various combinations or with other known methods, can also be employed to provide a substantially purified isolated recombinant protein. Preferably, the isolated
- 25 IL-21/IL-21R agonist protein is purified so that it is substantially free of other mammalian proteins or, if produced in bacteria, substantially free of other bacterial proteins, e.g., endotoxins.

- In other embodiments, the IL-21/IL-21R agonists are antibodies, or antigen-binding fragments thereof, that bind to, e.g., IL-21R, preferably, mammalian (e.g.,
- 30 human or murine) IL-21 or IL-21R, and activate an IL-21R activity.

As used herein, the term "antibody" refers to a protein comprising at least one, and preferably two, heavy (H) chain variable regions (abbreviated herein as VH), and at

least one and preferably two light (L) chain variable regions (abbreviated herein as VL).

The VH and VL regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed "complementarity determining regions" ("CDR"), interspersed with regions that are more conserved, termed "framework regions" (FR). The extent of the framework

5 region and CDR's has been precisely defined (see, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, and Chothia, C. *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917, which are incorporated herein by reference). Each VH and VL is composed of three CDR's and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-
10 terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

The antibody can further include a heavy and light chain constant region, to thereby form a heavy and light immunoglobulin chain, respectively. In one embodiment, the antibody is a tetramer of two heavy immunoglobulin chains and two light immunoglobulin chains, wherein the heavy and light immunoglobulin chains are
15 inter-connected by, e.g., disulfide bonds. The heavy chain constant region is comprised of three domains, CH1, CH2 and CH3. The light chain constant region is comprised of one domain, CL. The variable region of the heavy and light chains contains a binding domain that interacts with an antigen. The constant regions of the antibodies typically mediate the binding of the antibody to host tissues or factors, including various cells of
20 the immune system (e.g., effector cells) and the first component (C1q) of the classical complement system.

As used herein, the term "immunoglobulin" refers to a protein consisting of one or more polypeptides substantially encoded by immunoglobulin genes. The recognized human immunoglobulin genes include the kappa, lambda, alpha (IgA1 and IgA2),
25 gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, epsilon and mu constant region genes, as well as the myriad immunoglobulin variable region genes. Full-length immunoglobulin "light chains" (about 25 Kd or 214 amino acids) are encoded by a variable region gene at the NH2-terminus (about 110 amino acids) and a kappa or lambda constant region gene at the COOH-terminus. Full-length immunoglobulin "heavy chains" (about 50
30 Kd or 446 amino acids), are similarly encoded by a variable region gene (about 116 amino acids) and one of the other aforementioned constant region genes, e.g., gamma (encoding about 330 amino acids).

39

As used herein, "isotype" refers to the antibody class (e.g., IgM or IgG1) that is encoded by heavy chain constant region genes.

The term "antigen-binding fragment" of an antibody (or simply "antibody portion," or "fragment"), as used herein, refers to one or more fragments of a full-length

5 antibody that retain the ability to specifically bind to an antigen (e.g., IL-21R).

Examples of binding fragments encompassed within the term "antigen-binding fragment" of an antibody include (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the VL, VH, CL and CH1 domains; (ii) a F(ab')₂ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd

10 fragment consisting of the VH and CH1 domains; (iv) a Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody, (v) a dAb fragment (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), which consists of a VH domain; and (vi) an isolated complementarity determining region (CDR). Furthermore, although the two domains

of the Fv fragment, VL and VH, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the VL and VH regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); see *e.g.*, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883).

Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term "antigen-binding fragment" of an antibody. These antibody fragments are obtained using conventional techniques known to those with skill in the art, and the fragments are screened for utility in the same manner as are intact antibodies. An "effectively human" immunoglobulin variable region is an immunoglobulin variable region that includes a sufficient number of human framework amino acid positions such that the immunoglobulin variable region does not elicit an immunogenic response in a normal human. An "effectively human" antibody is an antibody that includes a sufficient number of human amino acid positions such that the antibody does not elicit an immunogenic response in a normal human. Human and effectively human immunoglobulin variable regions and antibodies can be used.

30 IL-21 or IL-21R proteins may be used to immunize animals (e.g., non-human animals and non-human animals include human immunoglobulin genes) to obtain polyclonal and monoclonal antibodies which specifically react with the IL-21/IL-21R

agonist protein and which may activate an IL-21R. Such antibodies may be obtained using the entire IL-21/IL-21R agonist protein as an immunogen, or by using fragments of IL-21/IL-21R. The peptide immunogens additionally may contain a cysteine residue at the carboxyl terminus, and are conjugated to a hapten such as keyhole limpet

5 hemocyanin (KLH). Additional peptide immunogens may be generated by replacing tyrosine residues with sulfated tyrosine residues. Methods for synthesizing such peptides are known in the art, for example, as in R. P. Merrifield, *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 2149-2154 (1963); J. L. Krstenansky, et al., *FEBS Lett.* 211, 10 (1987).

Human monoclonal antibodies (mAbs) directed against IL-21 or IL-21R can be
10 generated using transgenic mice carrying the human immunoglobulin genes rather than the mouse system. Splenocytes from these transgenic mice immunized with the antigen of interest are used to produce hybridomas that secrete human mAbs with specific affinities for epitopes from a human protein (see, e.g., WO 91/00906, WO 91/10741; WO 92/03918; WO 92/03917; Lonberg, N. et al. 1994 *Nature* 368:856-859; Green,
15 L.L. et al. 1994 *Nature Genet.* 7:13-21; Morrison, S.L. et al. 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855; Bruggeman et al. 1993 *Year Immunol* 7:33-40; Tuaillon et al. 1993 *PNAS* 90:3720-3724; Bruggeman et al. 1991 *Eur. J Immunol* 21:1323-1326).

Monoclonal antibodies can also be generated by other methods known to those skilled in the art of recombinant DNA technology. An alternative method, referred to
20 as the "combinatorial antibody display" method, has been developed to identify and isolate antibody fragments having a particular antigen specificity, and can be utilized to produce monoclonal antibodies (for descriptions of combinatorial antibody display see e.g., Sastry et al. 1989 *PNAS* 86:5728; Huse et al. 1989 *Science* 246:1275; and Orlandi et al. 1989 *PNAS* 86:3833). After immunizing an animal with an immunogen as
25 described above, the antibody repertoire of the resulting B-cell pool is cloned. Methods are generally known for obtaining the DNA sequence of the variable regions of a diverse population of immunoglobulin molecules by using a mixture of oligomer primers and PCR. For instance, mixed oligonucleotide primers corresponding to the 5' leader (signal peptide) sequences and/or framework 1 (FR1) sequences, as well as
30 primer to a conserved 3' constant region primer can be used for PCR amplification of the heavy and light chain variable regions from a number of murine antibodies (Larrick et al., 1991, *Biotechniques* 11:152-156). A similar strategy can also be used to

amplify human heavy and light chain variable regions from human antibodies (Larrick et al., 1991, *Methods: Companion to Methods in Enzymology* 2:106-110).

Chimeric antibodies, including chimeric immunoglobulin chains, can be produced by recombinant DNA techniques known in the art. For example, a gene
5 encoding the Fc constant region of a murine (or other species) monoclonal antibody molecule is digested with restriction enzymes to remove the region encoding the murine Fc, and the equivalent portion of a gene encoding a human Fc constant region is substituted (see Robinson et al., International Patent Publication PCT/US86/02269; Akira, et al., European Patent Application 184,187; Taniguchi, M., European Patent
10 Application 171,496; Morrison et al., European Patent Application 173,494; Neuberger et al., International Application WO 86/01533; Cabilly et al. U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly et al., European Patent Application 125,023; Better et al. (1988 *Science* 240:1041-1043); Liu et al. (1987) *PNAS* 84:3439-3443; Liu et al., 1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun et al. (1987) *PNAS* 84:214-218; Nishimura et al., 1987, *Canc. Res.*
15 47:999-1005; Wood et al. (1985) *Nature* 314:446-449; and Shaw et al., 1988, *J. Natl Cancer Inst.* 80:1553-1559).

An antibody or an immunoglobulin chain can be humanized by methods known in the art. Humanized antibodies, including humanized immunoglobulin chains, can be generated by replacing sequences of the Fv variable region which are not directly
20 involved in antigen binding with equivalent sequences from human Fv variable regions. General methods for generating humanized antibodies are provided by Morrison, S. L., 1985, *Science* 229:1202-1207, by Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4:214, and by Queen et al. US 5,585,089, US 5,693,761 and US 5,693,762, the contents of all of which are hereby incorporated by reference. Those methods include isolating, manipulating, and
25 expressing the nucleic acid sequences that encode all or part of immunoglobulin Fv variable regions from at least one of a heavy or light chain. Sources of such nucleic acid are well known to those skilled in the art and, for example, may be obtained from a hybridoma producing an antibody against a predetermined target. The recombinant DNA encoding the humanized antibody, or fragment thereof, can then be cloned into an
30 appropriate expression vector.

Humanized or CDR-grafted antibody molecules or immunoglobulins can be produced by CDR-grafting or CDR substitution, wherein one, two, or all CDR's of an

immunoglobulin chain can be replaced. See e.g., U.S. Patent 5,225,539; Jones et al. 1986 *Nature* 321:552-525; Verhoeyan et al. 1988 *Science* 239:1534; Beidler et al. 1988 *J. Immunol.* 141:4053-4060; Winter US 5,225,539, the contents of all of which are hereby expressly incorporated by reference. Winter describes a CDR-grafting method which may be used to prepare the humanized antibodies (UK Patent Application GB 2188638A, filed on March 26, 1987; Winter US 5,225,539), the contents of which is expressly incorporated by reference. All of the CDR's of a particular human antibody may be replaced with at least a portion of a non-human CDR or only some of the CDR's may be replaced with non-human CDR's. It is only necessary to replace the number of CDR's required for binding of the humanized antibody to a predetermined antigen.

In some implementations, monoclonal, chimeric and humanized antibodies can be modified by, e.g., deleting, adding, or substituting other portions of the antibody, e.g., the constant region. For example, an antibody can be modified as follows: (i) by deleting the constant region; (ii) by replacing the constant region with another constant region, e.g., a constant region meant to increase half-life, stability or affinity of the antibody, or a constant region from another species or antibody class; or (iii) by modifying one or more amino acids in the constant region to alter, for example, the number of glycosylation sites, effector cell function, Fc receptor (FcR) binding, complement fixation, among others.

Methods for altering an antibody constant region are known in the art. Antibodies with altered function, e.g. altered affinity for an effector ligand, such as FcR on a cell, or the C1 component of complement can be produced by replacing at least one amino acid residue in the constant portion of the antibody with a different residue (see e.g., EP 388,151 A1, US 5,624,821 and US 5,648,260). Similar type of alterations could be described which if applied to the murine, or other species immunoglobulin would reduce or eliminate these functions.

For example, it is possible to alter the affinity of an Fc region of an antibody (e.g., an IgG, such as a human IgG) for an FcR (e.g., Fc gamma R1), or for C1q binding by replacing the specified residue(s) with a residue(s) having an appropriate functionality on its side chain, or by introducing a charged functional group, such as glutamate or aspartate, or perhaps an aromatic non-polar residue such as phenylalanine, tyrosine, tryptophan or alanine (see e.g., US 5,624,821).

In one embodiment, an agonist of IL-21R is an agent that interacts with IL-21R and another receptor subunit, e.g., γc . For example, the agent can be a protein that interacts with IL-21R and another receptor subunit, e.g., γc . The protein can be, e.g., a bispecific antibody that includes one antigen binding site that interacts with IL-21R and another antigen binding site that interacts with γc . Binding of such a protein can be used to crosslink and agonize the receptor, e.g., activate or increase STAT3 or STAT5 signalling.

In one embodiment, an IL-21/IL-21R agonist is an agent (e.g., an immunoglobulin) that stabilizes an IL-21/IL-21R interaction, e.g., by binding one or both of IL-21 and IL-21R.

Agonists of IL-21/IL-21R proteins can be screened for, e.g., binding and/or activation of an IL-21R polypeptide using procedures known in the art. Binding assays using a desired binding protein, immobilized or not, are known in the art and may be used for this purpose using the IL-21R protein as described herein. Purified cell based or protein based (cell free) screening assays may be used to identify such agonists. For example, IL-21R protein may be immobilized in purified form on a carrier and binding or potential ligands to purified IL-21R protein may be measured. Cell-based assays for evaluating IL-21R activity and STAT3 or STAT5 signalling are known. Examples are described herein.

Pharmaceutical Compositions

IL-21/IL-21R-agonists may be used as a pharmaceutical composition when combined with a pharmaceutically acceptable carrier. Such a composition may contain, in addition to the IL-21/IL-21R-agonists and carrier, various diluents, fillers, salts, buffers, stabilizers, solubilizers, and other materials well known in the art. The term "pharmaceutically acceptable" means a non-toxic material that does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the active ingredient(s). The characteristics of the carrier will depend on the route of administration.

The pharmaceutical composition may further contain other anti-inflammatory agents as described in more detail below. Such additional factors and/or agents may be included in the pharmaceutical composition to produce a synergistic effect with an IL-21/IL-21R-agonists, or to minimize side effects caused by the IL-21/IL-21R-

agonists. Conversely IL-21/IL-21R-agonists may be included in formulations of the particular anti-inflammatory agent to minimize side effects of the anti-inflammatory agent.

The pharmaceutical composition may be in the form of a liposome in which
5 IL-21/IL-21R-agonists is combined, in addition to other pharmaceutically acceptable carriers, with amphipathic agents such as lipids which exist in aggregated form as micelles, insoluble monolayers, liquid crystals, or lamellar layers which in aqueous solution. Suitable lipids for liposomal formulation include, without limitation, monoglycerides, diglycerides, sulfatides, lysolecithin, phospholipids, saponin, bile
10 acids, and the like. Preparation of such liposomal formulations is within the level of skill in the art, as disclosed, for example, in U.S. Pat. No. 4,235,871; U.S. Pat. No. 4,501,728; U.S. Pat. No. 4,837,028; and U.S. Pat. No. 4,737,323, all of which are incorporated herein by reference.

As used herein, the term "therapeutically effective amount" means the total
15 amount of each active component of the pharmaceutical composition or method that is sufficient to show a meaningful patient benefit, e.g., amelioration of symptoms of, healing of, or increase in rate of healing of such conditions. When applied to an individual active ingredient, administered alone, the term refers to that ingredient alone. When applied to a combination, the term refers to combined amounts of the active
20 ingredients that result in the therapeutic effect, whether administered in combination, serially or simultaneously.

In practicing the method of treatment or use, a therapeutically effective amount of an IL-21/IL-21R-agonist is administered to a subject, e.g., mammal (e.g., a human). An IL-21/IL-21R-agonists may be administered either alone or in combination with
25 other therapies such as treatments employing anti-inflammatory agents. When co-administered with one or more agents, an IL-21- and/or IL-21R- agonist may be administered either simultaneously with the second agent, or sequentially. If administered sequentially, the attending physician can decide on the appropriate sequence of administering an IL-21/IL-21R-agonist in combination with other agents.
30 Administration of an IL-21/IL-21R-agonist used in the pharmaceutical composition or to practice the method of the present invention can be carried out in a variety of conventional ways, such as oral ingestion, intracranial, inhalation, or

VJ

cutaneous, subcutaneous, or intravenous injection or administration. For example, the composition can be delivered as an epidural or otherwise, e.g., to cerebrospinal fluid.

When a therapeutically effective amount of an IL-21/IL-21R-agonist is administered orally, the binding agent will be in the form of a tablet, capsule, powder, solution or elixir. When administered in tablet form, the pharmaceutical composition may additionally contain a solid carrier such as a gelatin or an adjuvant. The tablet, capsule, and powder contain from about 5 to 95% binding agent, and preferably from about 25 to 90% binding agent. When administered in liquid form, a liquid carrier such as water, petroleum, oils of animal or plant origin such as peanut oil, mineral oil, soybean oil, or sesame oil, or synthetic oils may be added. The liquid form of the pharmaceutical composition may further contain physiological saline solution, dextrose or other saccharide solution, or glycols such as ethylene glycol, propylene glycol or polyethylene glycol. When administered in liquid form, the pharmaceutical composition contains from about 0.5 to 90% by weight of the binding agent, and preferably from about 1 to 50% the binding agent.

When a therapeutically effective amount of an IL-21/IL-21R-agonist is administered by intravenous, cutaneous or subcutaneous injection, binding agent will be in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable aqueous solution. The preparation of such parenterally acceptable protein solutions, having due regard to pH, isotonicity, stability, and the like, is within the skill in the art. A preferred pharmaceutical composition for intravenous, cutaneous, or subcutaneous injection should contain, in addition to binding agent an isotonic vehicle such as sodium chloride injection, Ringer's injection, dextrose injection, dextrose and sodium chloride injection, lactated Ringer's injection, or other vehicle as known in the art. The pharmaceutical composition of the present invention may also contain stabilizers, preservatives, buffers, antioxidants, or other additive known to those of skill in the art.

The amount of an IL-21/IL-21R-agonist in the pharmaceutical composition of the present invention can depend upon the nature and severity of the condition being treated, and on the nature of prior treatments that the patient has undergone. The attending physician can decide the amount of agonist with which to treat each individual patient. Initially, for example, the attending physician can administer low doses of binding agent and observe the patient's response. Larger doses of binding

agent may be administered until the optimal therapeutic effect is obtained for the patient, and at that point the dosage is not generally increased further, or by monitoring cytokine levels or one or more symptoms. It is contemplated that the various pharmaceutical compositions used to practice the method of the present invention
5 should contain about 0.1 μ g to about 100 mg IL-21/IL-21R-agonist per kg body weight.

For example, useful dosages can include between about 10 μ g-1mg, 0.1-5mg, and 3-50 mg of IL-21/IL-21R agonist per kg body weight. Useful dosages of IL-21 can further include between about 5 μ g-1mg, 0.1-5mg, and 3-20 mg of IL-21/IL-21R agonist per kg body weight.

10 The duration of intravenous therapy using the pharmaceutical composition can vary, depending on the severity of the disease being treated and the condition and potential idiosyncratic response of each individual patient. The duration of each application of the IL-21/IL-21R-agonist can be, e.g., in the range of 12 to 24 hours of continuous intravenous administration. The attending physician can decide on the
15 appropriate duration of intravenous therapy using the pharmaceutical composition of the present invention.

In addition to IL-21/IL-21 agonists, where such agonists are proteins, the disease or disorder can be treated or prevented by administration or use of polynucleotides encoding such proteins (such as, for example, in gene therapies or vectors suitable for
20 introduction of DNA).

Uses of IL-21/IL-21R-Agonists to Enhance an Immune Response

In one aspect, the present invention provides methods for treating (e.g., curing, suppressing, ameliorating, delaying or preventing the onset of, or preventing recurrence
25 or relapse of) or preventing an immunological disorder of the nervous system (e.g., a chronic immunological disorder of the nervous system, including multiple sclerosis), in a subject. The method includes: administering to the subject an IL-21/IL-21R agonist, in an amount sufficient to modulate immune cell activity and/or cell number (e.g., to modulate cytokine levels, e.g., cytokine expression, production and/or release), thereby
30 treating or preventing the immunological disorder of the nervous system, e.g., multiple sclerosis.

Multiple sclerosis (MS) is a central nervous system disease that is characterized by inflammation and loss of myelin sheaths - the fatty material that insulates nerves and is needed for proper nerve function. Inflammation that results from an immune response that is modulated by on IL-21 can be prevented or treated with the

5 IL-21/IL-21R agonists described herein. In the experimental autoimmune encephalitis (EAE) mouse model for multiple sclerosis (Tuohy et al. (J. Immunol. (1988) 141: 1126-1130), Sobel et al. (J. Immunol. (1984) 132: 2393-2401), and Traugott (Cell Immunol. (1989) 119: 114-129), treatment of mice with IL-21 injections prior to EAE induction reduces the symptoms of the disease. Accordingly, the IL-21/IL-21R agonists described
10 herein may similarly be used to treat or prevent multiple sclerosis in humans.

Patients suitable for such treatment may be identified by criteria establishing a diagnosis of clinically definite MS as defined by the workshop on the diagnosis of MS (Poser et al., Ann. Neurol. 13:227, 1983). Briefly, an individual with clinically definite MS has had two attacks and clinical evidence of either two lesions or clinical evidence
15 of one lesion and paraclinical evidence of another, separate lesion. Definite MS may also be diagnosed by evidence of two attacks and oligoclonal bands of IgG in cerebrospinal fluid or by combination of an attack, clinical evidence of two lesions and oligoclonal band of IgG in cerebrospinal fluid. Slightly lower criteria are used for a diagnosis of clinically probable MS.

20 Effective treatment of multiple sclerosis may be examined in several different ways. Satisfying any of the following criteria evidences effective treatment. Three main criteria are used: EDSS (extended disability status scale), appearance of exacerbations or MRI (magnetic resonance imaging). The EDSS is a means to grade clinical impairment due to MS (Kurtzke, Neurology 33:1444, 1983). Eight functional
25 systems are evaluated for the type and severity of neurologic impairment. Briefly, prior to treatment, patients are evaluated for impairment in the following systems: pyramidal, cerebella, brainstem, sensory, bowel and bladder, visual, cerebral, and other. Follow-ups are conducted at defined intervals. The scale ranges from 0 (normal) to 10 (death due to MS). A decrease of one full step defines an effective treatment in the context of
30 the present invention (Kurtzke, Ann. Neurol. 36:573-79, 1994). Exacerbations are defined as the appearance of a new symptom that is attributable to MS and accompanied by an appropriate new neurologic abnormality (IFNB MS Study Group,

supra). In addition, the exacerbation must last at least 24 hours and be preceded by stability or improvement for at least 30 days. Briefly, patients are given a standard neurological examination by clinicians. Exacerbations are either mild, moderate, or severe according to changes in a Neurological Rating Scale (Sipe et al., Neurology 5 34:1368, 1984). An annual exacerbation rate and proportion of exacerbation-free patients are determined. Therapy is deemed to be effective if there is a statistically significant difference in the rate or proportion of exacerbation-free patients between the treated group and the placebo group for either of these measurements. In addition, time to first exacerbation and exacerbation duration and severity may also be measured. A 10 measure of effectiveness as therapy in this regard is a statistically significant difference in the time to first exacerbation or duration and severity in the treated group compared to control group.

MRI can be used to measure active lesions using gadolinium-DTPA-enhanced imaging (McDonald et al. Ann. Neurol. 36:14, 1994) or the location and extent of 15 lesions using T₂-weighted techniques. Briefly, baseline MRIs are obtained. The same imaging plane and patient position are used for each subsequent study. Positioning and imaging sequences can be chosen to maximize lesion detection and facilitate lesion tracing. The same positioning and imaging sequences can be used on subsequent studies. The presence, location and extent of MS lesions can be determined by 20 radiologists. Areas of lesions can be outlined and summed slice by slice for total lesion area. Three analyses may be done: evidence of new lesions, rate of appearance of active lesions, percentage change in lesion area (Paty et al., Neurology 43:665, 1993). Improvement due to therapy can be established by a statistically significant improvement in an individual patient compared to baseline or in a treated group versus 25 a placebo group.

Exemplary symptoms associated with multiple sclerosis include: optic neuritis, diplopia, nystagmus, ocular dysmetria, internuclear ophthalmoplegia, movement and sound phosphenes, afferent pupillary defect, paresis, monoparesis, paraparesis, hemiparesis, quadraparesis, plegia, paraplegia, hemiplegia, tetraplegia, quadraplegia, 30 spasticity, dysarthria, muscle atrophy, spasms, cramps, hypotonia, clonus, myoclonus, myokymia, restless leg syndrome, footdrop, dysfunctional reflexes, paraesthesia, anaesthesia, neuralgia, neuropathic and neurogenic pain, l'hermitte's, proprioceptive

dysfunction, trigeminal neuralgia, ataxia, intention tremor, dysmetria, vestibular ataxia, vertigo, speech ataxia, dystonia, dysdiadochokinesia, frequent micturation, bladder spasticity, flaccid bladder, detrusor-sphincter dyssynergia, erectile dysfunction, anorgasmy, frigidity, constipation, fecal urgency, fecal incontinence, depression, cognitive dysfunction, dementia, mood swings, emotional lability, euphoria, bipolar syndrome, anxiety, aphasia, dysphasia, fatigue, Uhthoff's symptom, gastroesophageal reflux, and sleeping disorders.

Candidate patients for prevention may be identified by the presence of genetic factors. For example, a majority of MS patients have HLA-type DR2a and DR2b. The MS patients having genetic dispositions to MS who are suitable for treatment fall within two groups. First are patients with early disease of the relapsing remitting type. Entry criteria can include disease duration of more than one year, EDSS score of 1.0 to 3.5, exacerbation rate of more than 0.5 per year, and free of clinical exacerbations for 2 months prior to study. The second group would include people with disease progression greater than 1.0 EDSS unit/year over the past two years. Candidate patients for prevention may be identified by evaluating cytokine parameters, e.g., an IL-10 or IL-21 parameter.

Efficacy of the IL-21/IL-21R agonist in the context of prevention is judged based on the following criteria: frequency of MBP reactive T cells determined by limiting dilution, proliferation response of MBP reactive T cell lines and clones, cytokine profiles of T cell lines and clones to MBP established from patients. Efficacy is established by decrease in frequency of reactive cells, a reduction in thymidine incorporation with altered peptide compared to native, and a reduction in TNF and IFN- α . Clinical measurements include the relapse rate in one and two-year intervals, and a change in EDSS, including time to progression from baseline of 1.0 unit on the EDSS which persists for six months. On a Kaplan-Meier curve, a delay in sustained progression of disability shows efficacy. Other criteria include a change in area and volume of T2 images on MRI, and the number and volume of lesions determined by gadolinium enhanced images.

In one embodiment, the IL-21/IL-21R agonists, e.g., pharmaceutical compositions thereof, are administered in combination therapy, i.e., combined with other agents, e.g., therapeutic agents, which are useful for treating pathological

50

conditions or disorders, such as immune and inflammatory disorders of the brain, e.g., multiple sclerosis. The term "in combination" in this context means that the agents are given substantially contemporaneously, either simultaneously or sequentially. If given sequentially, at the onset of administration of the second compound, the first of the two
5 compounds is preferably still detectable at effective concentrations at the site of treatment.

For example, the combination therapy can include one or more IL-21/IL-21R agonists (e.g., an IL-21 polypeptide or fusion protein, a peptide agonist or a small molecule agonist) co-formulated with, and/or co-administered with, one or more
10 additional therapeutic agents, e.g., one or more cytokine and growth factor inhibitors, immunosuppressants, anti-inflammatory agents, metabolic inhibitors, enzyme inhibitors, and/or cytotoxic or cytostatic agents, as described in more detail below. Furthermore, one or more IL-21/IL-21R agonists described herein may be used in combination with two or more of the therapeutic agents described herein. Such
15 combination therapies may advantageously utilize lower dosages of the administered therapeutic agents, thus avoiding possible toxicities or complications associated with the various monotherapies. Moreover, the therapeutic agents disclosed herein act on pathways that differ from the IL-21/IL-21R receptor pathway, and thus are expected to enhance and/or synergize with the effects of the IL-21/IL-21R agonists. Preferred
20 therapeutic agents used in combination with an IL-21/IL-21R agonist are those agents that interfere at different stages in the autoimmune and subsequent inflammatory response.

Non-limiting examples of agents for treating or preventing multiple sclerosis with which an IL-21/IL21R agonist can be combined include the following:
25 interferons, e.g., interferon-beta-1 α (e.g., AVONEX™; Biogen) and interferon-1 β (BETASERON™; human interferon β substituted at position 17; Berlex/Chiron); glatiramer acetate (also termed Copolymer 1, Cop-1; COPAXONE™; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); hyperbaric oxygen; intravenous immunoglobulin; clabribine; TNF antagonists as described herein; corticosteroids; prednisolone;
30 methylprednisolone; azathioprine; cyclophosphamide; cyclosporine; methotrexate; 4-aminopyridine; and tizanidine. Additional antagonists that can be used in combination with IL-21 agonists include antibodies to, or antagonists of, other human cytokines or

growth factors, for example, TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-11, GM-CSF, FGF, and PDGF. IL-21 agonists as described herein can be combined with antibodies to cell surface molecules such as CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 or their ligands.

- 5 The IL-21 agonists may also be combined with agents, such as methotrexate, cyclosporine, FK506, rapamycin, mycophenolate mofetil, leflunomide, NSAIDs, for example, ibuprofen, corticosteroids such as prednisolone, phosphodiesterase inhibitors, adenosine agonists, antithrombotic agents, complement inhibitors, adrenergic agents, agents which interfere with signaling by proinflammatory cytokines as described herein,
- 10 IL-1 β converting enzyme inhibitors (e.g., Vx740), anti-P7s, PSGL, TACE inhibitors, T-cell signaling inhibitors such as kinase inhibitors, metallopeptidase inhibitors, sulfasalazine, azathioprine, 6-mercaptopurines, angiotensin converting enzyme inhibitors, soluble cytokine receptors and derivatives thereof, as described herein, and anti-inflammatory cytokines (e.g. IL-4, IL-10, IL-13 and TGF).

- 15 Examples of therapeutic agents for treating or preventing multiple sclerosis with which the IL-21/IL-21R agonists can be combined include interferon- β , for example, IFN β -1 α and IFN β -1 β ; glatiramer acetate (e.g. COPAXONE[®]), corticosteroids, IL-1 inhibitors, TNF inhibitors, antibodies to CD40 ligand and CD80, and IL-12 antagonists. Additional examples include agents that may be used to treat one or more symptoms or
- 20 side effects of MS, e.g., amantadine, baclofen, mineral oil, papaverine, meclizine, hydroxyzine, sulfamethoxazole, ciprofloxacin, docusate, ciprofloxacin, pemoline, dantrolene, desmopressin, desmopressin, dexamethasone, prednisone, tolterodine, phenytoin, oxybutynin, oxybutynin (extended release formula), bisacodyl, venlafaxine, amitriptyline, docusate stool softener laxative, sodium phosphate, methenamine,
- 25 baclofen (intrathecal), clonazepam, isoniazid, vardenafil, nitrofurantoin, psyllium hydrophilic mucilloid, alprostadil, gabapentin, mitoxantrone, oxybutynin, nortriptyline, paroxetine, magnesium hydroxide, propantheline bromide, alprostadil, modafinil, fluoxetine, phenazopyridine, glycerin, methylprednisolone, carbamazepine, imipramine, diazepam, sildenafil, bupropion, tizanidine, and sertraline.

- 30 Examples of those agents include IL-12 antagonists, such as chimeric, humanized, human or in vitro generated antibodies (or antigen-binding fragments thereof) that bind to IL-12 (preferably human IL-12), e.g., the antibody disclosed in WO

00/56772, Genetics Institute/BASF); IL-12 receptor inhibitors, e.g., antibodies to human IL-12 receptor; and soluble fragments of the IL-12 receptor, e.g., human IL-12 receptor. Examples of IL-15 antagonists include antibodies (or antigen-binding fragments thereof) against IL-15 or its receptor, e.g., chimeric, humanized, human or *in vitro* generated antibodies to human IL-15 or its receptor, soluble fragments of the IL-15 receptor, and IL-15-binding proteins. Examples of IL-18 antagonists include antibodies, e.g., chimeric, humanized, human or *in vitro* generated antibodies (or antigen-binding fragments thereof), to human IL-18, soluble fragments of the IL-18 receptor, and IL-18 binding proteins (IL-18BP, Mallet et al. (2001) *Circ. Res.* 28).

10 Examples of IL-1 antagonists include Interleukin-1-converting enzyme (ICE) inhibitors, such as Vx740, IL-1 antagonists, e.g., IL-1RA (ANIKINRA, AMGEN), sIL1RII (Immunex), and anti-IL-1 receptor antibodies (or antigen-binding fragments thereof).

Examples of TNF antagonists include chimeric, humanized, human or *in vitro* generated antibodies (or antigen-binding fragments thereof) to TNF (e.g., human TNF a), such as D2E7, (human TNFa antibody, U.S. 6,258,562; BASF), CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356 (humanized anti-TNFa antibody; Celltech/Pharmacia), cA2 (chimeric anti-TNFa antibody; Remicade™, Centocor); anti-TNF antibody fragments (e.g., CPD870); soluble fragments of the TNF receptors, e.g., p55 or p75 human TNF receptors or derivatives thereof, e.g., 75 kDTNFR-IgG (75 kD TNF receptor-IgG fusion protein, ENBREL™; Immunex; see e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44, 235A), p55 kDTNFR-IgG (55 kD TNF receptor-IgG fusion protein (LENERCEPT™)); enzyme antagonists, e.g., TNFa converting enzyme (TACE) inhibitors (e.g., an alpha-sulfonyl hydroxamic acid derivative, WO 01/55112, and N-hydroxyformamide TACE inhibitor GW 3333, -005, or -022); and 25 TNF-bp/s-TNFR (soluble TNF binding protein; see e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S284; *Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology* (1995) Vol. 268, pp. 37-42). Preferred TNF antagonists are soluble fragments of the TNF receptors, e.g., p55 or p75 human TNF receptors or derivatives thereof, e.g., 75 kDTNFR-IgG, and TNFa converting enzyme (TACE) inhibitors.

30 In other embodiments, the IL-21-/IL21R agonists described herein can be administered in combination with one or more of the following: IL-13 antagonists, e.g., soluble IL-13 receptors (sIL-13) and/or antibodies against IL-13; IL-2 antagonists, e.g.,

DAB 486-IL-2 and/or DAB 389-IL-2 (IL-2 fusion proteins; Seragen; see e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1993) Vol. 36, 1223), and/or antibodies to IL-2R, e.g., anti-Tac (humanized anti-IL-2R; Protein Design Labs, Cancer Res. 1990 Mar 1;50(5):1495-502).

Yet another combination includes IL-21 antagonists in combination with non-depleting anti-CD4 inhibitors (IDEC-CE9.1/SB 210396 (non-depleting primatized anti-CD4 antibody; IDEC/SmithKline). Yet other preferred combinations include antagonists of the co-stimulatory pathway CD80 (B7.1) or CD86 (B7.2) including antibodies, soluble receptors or antagonistic ligands; as well as p-selectin glycoprotein ligand (PSGL), anti-inflammatory cytokines, e.g., IL-4 (DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; recombinant IL-10 DNAX/Schering); IL-13 and TGF, and agonists thereof (e.g., agonist antibodies).

In other embodiments, one or more IL-21/IL21R agonists can be co-formulated with, and/or co-administered with, one or more anti-inflammatory drugs, immunosuppressants, or metabolic or enzymatic inhibitors. Non-limiting examples of the drugs or inhibitors that can be used in combination with the IL-21 agonists described herein, include, but are not limited to, one or more of: non-steroidal anti-inflammatory drug(s) (NSAIDs), e.g., ibuprofen, Tenidap (see e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S280)), Naproxen (see e.g., *Neuro Report* (1996) Vol. 7, pp. 1209-1213), Meloxicam, Piroxicam, Diclofenac, and Indomethacin; Sulfasalazine (see e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S281); corticosteroids such as prednisolone; cytokine suppressive anti-inflammatory drug(s) (CSAIDs); inhibitors of nucleotide biosynthesis, e.g., inhibitors of purine biosynthesis, folate antagonists (e.g., methotrexate (N-[4-[(2,4-diamino-6-pteridiny)methyl]methylamino]benzoyl]-L-glutamic acid); and inhibitors of pyrimidine biosynthesis, e.g., dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitors (e.g., leflunomide (see e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S131; *Inflammation Research* (1996) Vol. 45, pp. 103-107). Preferred therapeutic agents for use in combination with IL-21/IL-21R antagonists include NSAIDs, CSAIDs, (DHODH) inhibitors (e.g., leflunomide), and folate antagonists (e.g., methotrexate).

Examples of additional inhibitors include one or more of: corticosteroids (oral, inhaled and local injection); immunosuppressants, e.g., cyclosporin, tacrolimus (FK-506); and mTOR inhibitors, e.g., sirolimus (rapamycin) or rapamycin derivatives, e.g., soluble rapamycin derivatives (e.g., ester rapamycin derivatives, e.g., CCI-779 (Eli L.

(2002) *Current Opinion Investig. Drugs* 3(8):1249-53; Huang, S. et al.. (2002) *Current Opinion Investig. Drugs* 3(2):295-304); agents which interfere with signaling by proinflammatory cytokines such as TNF α or IL-1 (e.g. IRAK, NIK, IKK, p38 or MAP kinase inhibitors); COX2 inhibitors, e.g., celecoxib and variants thereof, MK-966, see e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S81);
 5 phosphodiesterase inhibitors, e.g., R973401 (phosphodiesterase Type IV inhibitor; see e.g., *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (supplement), S282));
 phospholipase inhibitors, e.g., inhibitors of cytosolic phospholipase 2 (cPLA2) (e.g., trifluoromethyl ketone analogs (U.S. 6,350,892)); inhibitors of vascular endothelial cell
 10 growth factor or growth factor receptor, e.g., VEGF inhibitor and/or VEGF-R inhibitor; and inhibitors of angiogenesis. Preferred therapeutic agents for use in combination with IL-21/IL-21R antagonists immunosuppressants, e.g., cyclosporin, tacrolimus (FK-506); and mTOR inhibitors, e.g., sirolimus (rapamycin) or rapamycin derivatives, e.g., soluble rapamycin derivatives (e.g., ester rapamycin derivatives, e.g., CCI-779; COX2
 15 inhibitors, e.g., celecoxib and variants thereof; and phospholipase inhibitors, e.g., inhibitors of cytosolic phospholipase 2 (cPLA2) (e.g., trifluoromethyl ketone analogs)

Additional examples of therapeutic agents that can be combined with an IL-21/IL-21R agonist include one or more of: 6-mercaptopurines (6-MP); azathioprine sulphasalazine; mesalazine; olsalazine chloroquine/hydroxychloroquine;
 20 pencillamine; aurothiomalate (intramuscular and oral); azathioprine; cochlincine; beta-2 adrenoreceptor agonists (salbutamol, terbutaline, salmeterol); xanthines (theophylline, aminophylline); cromoglycate; nedocromil; ketotifen; ipratropium and oxitropium; mycophenolate mofetil; adenosine agonists; antithrombotic agents; complement inhibitors; and adrenergic agents.

25 Another aspect of the present invention accordingly relates to kits for carrying out the combined administration of the IL-21/IL21R antagonists with other therapeutic compounds. In one embodiment, the kit comprises one or more binding agents formulated in a pharmaceutical carrier, and at least one agent, e.g., therapeutic agent, formulated as appropriate, in one or more separate pharmaceutical preparations.

30

Assays for Evaluating Cytokine Levels

Any standard assay can be used to evaluate cytokine levels in a sample or a subject. For example, the sample can be obtained from a subject or can include culture cells. Exemplary samples can be obtained or derived from one or more cells, tissue, or
5 bodily fluids such as blood, urine, lymphatic fluid, cerebrospinal fluid, or amniotic fluid, cultured cells (e.g., tissue culture cells), buccal swabs, mouthwash, stool, tissues slices, and biopsy materials (e.g., biopsy aspiration).

Methods for evaluating cytokine levels include evaluating nucleic acids to detect mRNA or cDNA encoding a cytokine of interest (e.g., IL-10 or IL-21) or
10 evaluating proteins to detect the cytokine itself. Nucleic acids can be evaluated, e.g., using RT-PCR (e.g., quantitative PCR) or nucleic acid microarrays. Proteins can be evaluated, e.g., using mass spectroscopy or an immunoassay.

ELISAs provide one convenient form of immunoassay. For example, Biosource International, Camarillo CA provides assay reagents that can be used to detect IL-10
15 with a sensitivity of < 0.2 pg/ml and to IL-12 with a sensitivity of < 2 pg/ml). Similarly, R&D Systems provides reagents to detect IFN- γ with a sensitivity < 8 pg/ml or TGF-beta1 with a sensitivity of < 7 pg/ml.

SEARCHLIGHT™ Proteome Array System (Pierce, Boston Technology Center) provides comprehensive reagents for evaluating multiple cytokines at once.

20 These methods can be used to evaluate administration of an IL-21/IL-21R agonist. For example, to determine if such agonist causes a statistically significant change in the levels of a cytokine, e.g., IL-10 or IFN γ or to determine if it causes an acceptable changes, e.g., to a level in a range of normal of a cytokine, e.g., IL-10 or IFN γ . Information from the evaluating can be used to modulate the dosage of the
25 agonist. For example, if IL-10 levels are not increased to levels within the range of a normal subject, administration of the agonist can be increased, e.g., by increasing dosage or frequency. Conversely, if IL-10 levels are increased beyond the desired range, the administration of the agonist can be decreased, e.g., by decreasing dosage or frequency.

30

Assays for Evaluating the Activity of IL-21/IL21R Agonists as Immune Activators

The activity of IL-21/IL21R agonists as activators of an immune system can, among other means, be measured by the following methods:

Suitable assays for thymocyte or splenocyte cytotoxicity include, without
5 limitation, those described in: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Herrmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:2488-2492, 1981; Herrmann et al., J. Immunol. 128:1968-
10 1974, 1982; Handa et al., J. Immunol. 135:1564-1572, 1985; Takai et al., J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai et al., J. Immunol. 140:508-512, 1988; Herrmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:2488-2492, 1981; Herrmann et al., J. Immunol. 128:1968-1974, 1982; Handa et al., J. Immunol. 135:1564-1572, 1985; Takai et al., J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Bowman et al., J. Virology 61:1992-1998; Takai et al.,
15 J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bertagnolli et al., Cellular Immunology 133:327-341, 1991; Brown et al., J. Immunol. 153:3079-3092, 1994.

Assays for T-cell-dependent immunoglobulin responses and isotype switching (which will identify, among others, proteins that modulate T-cell dependent antibody responses and that affect Th1/Th2 profiles) include, without limitation, those described
20 in: Maliszewski, J. Immunol. 144:3028-3033, 1990; and Assays for B cell function: In vitro antibody production, Mond, J. J. and Brunswick, M. In Current Protocols in Immunology. J. E.e.a. Coligan eds, Vol 1 pp. 3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

Mixed lymphocyte reaction (MLR) assays (which will identify, among others,
25 proteins that generate predominantly Th1 and CTL responses) include, without limitation, those described in: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan; A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Takai et al., J.
30 Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai et al., J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bertagnolli et al., J. Immunol. 149:3778-3783, 1992.

Dendritic cell-dependent assays (which will identify, among others, proteins expressed by dendritic cells that activate naive T-cells) include, without limitation, those described in: Guery et al., *J. Immunol.* 134:536-544, 1995; Inaba et al., *Journal of Experimental Medicine* 173:549-559, 1991; Macatonia et al., *Journal of Immunology* 154:5071-5079, 1995; Porgador et al., *Journal of Experimental Medicine* 182:255-260, 1995; Nair et al., *Journal of Virology* 67:4062-4069, 1993; Huang et al., *Science* 264:961-965, 1994; Macatonia et al., *Journal of Experimental Medicine* 169:1255-1264, 1989; Bhardwaj et al., *Journal of Clinical Investigation* 94:797-807, 1994; and Inaba et al., *Journal of Experimental Medicine* 172:631-640, 1990.

Assays for lymphocyte survival/apoptosis (which will identify, among others, proteins that prevent apoptosis after superantigen induction and proteins that regulate lymphocyte homeostasis) include, without limitation, those described in: Darzynkiewicz et al., *Cytometry* 13:795-808, 1992; Gorczyca et al., *Leukemia* 7:659-670, 1993; Gorczyca et al., *Cancer Research* 53:1945-1951, 1993; Itoh et al., *Cell* 66:233-243, 1991; Zacharchuk, *Journal of Immunology* 145:4037-4045, 1990; Zamai et al., *Cytometry* 14:891-897, 1993; Gorczyca et al., *International Journal of Oncology* 1:639-648, 1992.

Assays for proteins that influence early steps of T-cell commitment and development include, without limitation, those described in: Antica et al., *Blood* 84:111-117, 1994; Fine et al., *Cellular Immunology* 155:111-122, 1994; Galy et al., *Blood* 85:2770-2778, 1995; Toki et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 88:7548-7551, 1991.

Assays for evaluating activation of STAT are described, e.g., in Gilmour et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:10772-10776. For example, evaluated cells (e.g., cells treated with an agonist or a candidate agonist) can be lysed and tyrosine phosphorylated proteins can be immunoprecipitated with an anti-phosphotyrosine antibody. Then precipitated materials can then be evaluated using antibodies specific for a signalling pathway component, e.g., an antibody to the STAT protein, e.g., STAT5.

Assays for Measuring the Activity of IL-21/IL21R Agonists as Modulators of Cytokine Production and Cell Proliferation/Differentiation

The activity of IL-21/IL21R agonists as modulator of cytokine production and cell proliferation/differentiation can be tested using any one of a number of routine factor dependent cell proliferation assays for cell lines including, without limitation, 32D, DA2, DA1G, T10, B9, B9/11, BaF3, MC9/G, M+(preB M+), 2E8, RB5, DA1,
5 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e and CMK.

Assays for T-cell or thymocyte proliferation include without limitation those described in: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-
10 3.19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Takai et al., J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Bertagnolli et al., J. Immunol. 145:1706-1712, 1990; Bertagnolli et al., Cellular Immunology 133:327-341, 1991; Bertagnolli, et al., J. Immunol. 149:3778-3783, 1992; Bowman et al., J. Immunol. 152: 1756-1761, 1994.

Assays for cytokine production and/or proliferation of spleen cells, lymph node
15 cells or thymocytes include, without limitation, those described in: Polyclonal T cell stimulation, Kruisbeek, A. M. and Shevach, E. M. In Current Protocols in Immunology. J. E.e.a. Coligan eds. Vol 1 pp. 3.12.1-3.12.14, John Wiley and Sons, Toronto. 1994; and Measurement of mouse and human Interferon gamma, Schreiber, R. D. In Current Protocols in Immunology. J. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.8.1-6.8.8, John Wiley and Sons,
20 Toronto. 1994.

Assays for proliferation and differentiation of hematopoietic and lymphopoietic cells include, without limitation, those described in: Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4, Bottomly, K., Davis, L. S. and Lipsky, P. E. In Current Protocols in Immunology. J. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.3.1-6.3.12, John Wiley
25 and Sons, Toronto. 1991; deVries et al., J. Exp. Med. 173:1205-1211, 1991; Moreau et al., Nature 336:690-692, 1988; Greenberger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2931-2938, 1983; Measurement of mouse and human interleukin 6—Nordan, R. In Current Protocols in Immunology. J. E.e.a. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.6.1-6.6.5, John Wiley and Sons, Toronto. 1991; Smith et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:1857-
30 1861, 1986; Measurement of human Interleukin 11—Bennett, F., Giannotti, J., Clark, S. C. and Turner, K. J. In Current Protocols in Immunology. J. E.e.a. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.15.1 John Wiley and Sons, Toronto. 1991; Measurement of mouse and human

Interleukin 9--Ciarletta, A., Giannotti, J., Clark, S. C. and Turner, K. J. In Current Protocols in Immunology. J. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.13.1, John Wiley and Sons, Toronto. 1991.

Assays for T-cell clone responses to antigens (which will identify, among others, proteins that affect APC-T cell interactions as well as direct T-cell effects by measuring proliferation and cytokine production) include, without limitation, those described in: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function; Chapter 6, Cytokines and their cellular receptors; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Weinberger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:6091-6095, 1980; Weinberger et al., Eur. J. Immun. 11:405-411, 1981; Takai et al., J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai et al., J. Immunol. 140:508-512, 1988.

In the following non-limiting example, we demonstrate, *inter alia*, that IL-21 results in partial protection in EAE mice.

Example : IL-21 results in partial protection in EAE mice

Reagents

Mice

Female C57BL/6 and female SJL/J mice were obtained from The Jackson Laboratory. The animals were housed within an AAALAC-approved barrier facility and monitored for parasites as well as bacterial and viral pathogens. All mice were used at 8-10 weeks of age.

Proliferative response

Lymph node cells of C57BL/6 female mice challenged with the mouse oligodendrocyte glycoprotein (MOG)₃₅₋₅₅ peptide were harvested from the mice 20 days after immunization. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Media (DME) containing 10% fetal calf serum (FCS). The cells were restimulated with the MOG₃₅₋₅₅ peptide (25 µg/ml) and grown in flat-bottom 96-well microtiter plates in the presence or absence of murine IL-21. After 72 hours, the plates were pulsed with 0.5

μ Ci tritiated thymidine/well and incubated for a 4- to 6-hour period. The mean incorporation of thymidine in the DNA in the triplicate wells was measured by a scintillation counter.

5 Cytokine quantitation

Lymph node cells derived from immunized mice were activated in vitro with 25 μ g/ml of the MOG₃₅₋₅₅ peptide. Cells were cultured in (DME) containing 10% FCS and IL-2 (10 U/ml) and various concentrations of murine IL-21 ranging from 5 ng/ml to 25 ng/ml. Culture supernatants were collected after 72 hours and were analyzed for cytokine and chemokine production using the SEARCHLIGHT™ Proteome Array System (Pierce, Boston Technology Center).

Induction and assessment of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)

Female SJL/J mice were immunized subcutaneously with 100 μ g of the proteolipid protein (PLP)₁₃₉₋₁₅₁ peptide emulsified in complete Freund's adjuvant supplemented with 800 μ g of *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra (Difco Laboratories). Mice also received intraperitoneal injections with 400 ng of pertussis toxin (List Biological Laboratories) at the time of immunization and 48 hours later. Animals were scored daily for clinical signs of EAE according to the following scale: 0, no disease; 1, limp tail; 2, hind limb weakness or partial paralysis; 3, complete hind limb paralysis; 4, front and hind limb paralysis, and 5, moribund. The mean clinical score was calculated by averaging the individual scores of the mice in each group.

IL-21 administration in vivo

Mice sensitized for EAE were given intraperitoneal injections of murine IL-21 at 100 ng/day or 1 μ g/day in 0.2 ml of PBS. The control mice were dosed with 0.2 ml of saline. Treatment began on the day prior to immunization with the PLP₁₃₉₋₁₅₁ peptide and continued on alternate days for a total of ten doses.

30 Proliferative response and cytokine production induced by murine IL-21

The effect of IL-21 on the induction and expansion of MOG₃₅₋₅₅-specific T cell responses was evaluated. The results indicate that IL-21 induces proliferation of

lymphocytes in a dose dependent manner. In Figure 1A and Table 1, lymphocytes cultured with 20 ng/ml of IL-21 showed a significant 3.5-fold increase in proliferation as compared to cells stimulated with peptide alone. Upon titration of the cytokine, the cells exhibited a similar proliferative capacity as the control cells.

5

Table 1: Lymphocyte proliferation in the presence of IL-21

Dilution	Control CPM/bgd	IL-21 CPM/bgd	ng/ml
1:50	1.14	3.57	20
1:250	0.95	3.01	4
1:1250	1.04	2.02	0.8
1:6250	1.49	1.86	0.16
1:31250	1.13	1.70	0.032
1:156250 dil	1.77	1.45	0.0064

Figure 1B shows increased proliferation of T cells from proteolipid protein (PLP) transgenic mice cultured at the indicated concentration of murine IL-21 (ng/ml) compared to cells treated with only 1 µg/ml of PLP.

10

To identify whether the proliferative T cell response could be correlated with cytokine production, lymphocytes were cultured with IL-21. IL-21 induced increased secretion of the Th2 cytokine, IL-10, as compared to untreated cells. This response was saturable (Figure 2 and Table 2) and at the highest tested concentration of IL-21 (25 ng/ml), cells produced approximately 2.5-fold more IL-10 than the control group.

15

Table 2: IL-21 induces IL-10 secretion

IL-21 (ng/ml)	IL-10 detected (pg/ml)
0	189.3
5	260.8
10	457.3
15	466.8
20	486.1
25	515.0

Figure 3 shows a decrease in secretion of IFN γ by spleen cells treated with the indicated concentrations of murine IL-21 compared to control cells. Addition of IL-21 to MOG 33-55-stimulated spleen cells from immunized mice results in a two-fold decrease of IFN γ , whereas addition of IL-21R yields a two-fold increase. When lymph node cells were treated with IL-21, IFN γ levels were decreased from 20,000 pg/ml (control) or 15840 pg/ml (mock treated) to 3260 pg/ml (IL-21 treated).

The changes in cytokine secretion upon IL-21 or IL-21R treatment are summarized as follows in Table 3.

Table 3: Changes in Cytokine Secretion

	IL-21 Treatment	IL-21R Treatment
Increase	IL-10	IL-12, IFN γ , TGF β
Decrease	IL-1 α , IL-2, IL-6, IFN γ , IL-18	None
No Change	IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, TNF α , TGF β , MIP-1 α , GM-CSF	IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-18, TNF α , MIP-1 α , GM-CSF

Development of EAE in mice treated with IL-21

To determine the role of IL-21 in the development of EAE, mice were immunized with the encephalitogenic PLP₁₃₉₋₁₅₁ peptide in CFA plus pertussis toxin and treated them with a prophylactic regimen of IL-21. The clinical course of EAE was compared in mice treated with saline or IL-21.

Table 4 documents average changes in cytokine secretion in two exemplary PLP cultures treated in the presence or absence of murine IL-21. The cytokine level in the untreated control cells is normalized to 100.

Table 4

Cytokine	Control	Treated w/ mIL-21
IL2	100	59
IL5	100	73
IL6	100	56
IL10	100	250
IFNg	100	39
TNFa	100	56
GMCSF	100	15

5

As shown in Figures 4 and 5, control mice were highly susceptible to disease. In contrast, mice treated with either a low (100 ng/day) or high (1 µg/day) dose of IL-21 had less severe clinical scores.

Figure 5 and Table 5 shows a decrease in the severity of EAE in mice treated with either a low (100 ng/day) or high (1 µg /day) dose of murine IL-21 compared to control mice.

10

Table 5

Day	NaCl	100 ng IL-21	1 µg IL-21
8	0.7	0.0	0.1
10	2.9	0.0	0.8
12	2.8	1.0	0.8
14	3.3	1.0	1.0
16	3.5	1.2	1.7
18	3.5	1.6	1.9
21	3.5	1.4	1.9
23	3.6	1.3	2.4
25	3.8	1.7	2.1

Our findings indicate that IL-21 is involved in modulating EAE progression and this pathway be mediated by upregulation of IL-10.

15

The contents of all references, pending patent applications and published patents, cited throughout this application are hereby expressly incorporated by reference.

5 **Equivalents**

Those skilled in the art will recognize, or be able to ascertain using no more than routine experimentation, many equivalents of the specific embodiments of the invention described herein. Such equivalents are intended to be encompassed by the following claims.

10

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of ameliorating a symptom of multiple sclerosis in a subject, the method comprising:

5 administering to the subject an agonist of an interleukin-21 (IL-21)/IL-21 receptor (IL-21R), in an amount sufficient to ameliorate a symptom of multiple sclerosis, wherein said agonist is selected from the group consisting of an IL-21 polypeptide, an agonistic anti-IL21R antibody and an antigen-binding fragment of an agonistic anti-IL21R antibody.

10

2. The method of claim 1, wherein the agonist is an IL-21 polypeptide that comprises a sequence at least 90% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 and is capable of binding to an IL-21R.

15

3. The method of claim 1, wherein the agonist is an IL-21 polypeptide that comprises a sequence at least 95% identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 and is capable of binding to an IL-21R.

20

4. The method of claim 1, wherein the agonist is an IL-21 polypeptide that comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

5. The method of claim 1, wherein the agonist is an agonistic anti-IL21R antibody or an antigen-binding fragment thereof.

25

6. The method of claim 5, wherein the agonistic anti-IL21R antibody is a human antibody.

7. The method of claim 1, further comprising administering to the subject at least one anti-inflammatory agent.

30

66

8. The method of claim 7, wherein the anti-inflammatory agent is selected from the group consisting of IFN β -1 α , IFN β -1 β , TNF antagonists, IL-12 antagonists, IL-23 antagonists, methotrexate, leflunomide, sirolimus (rapamycin), and CCI-779.

5 9. The method of claim 1, wherein the subject is a mammal.

10. The method of claim 1, wherein the IL-21/IL-21R agonist is administered in the form of a single dose.

10 11. The method of claim 1, wherein the IL-21/IL-21R agonist is administered as a series of doses separated by intervals of days, weeks or months.

12. The method of claim 1, wherein the IL-21/IL-21R agonist is administered by injection.

15

13. The method of claim 12, wherein the IL-21/IL-21R agonist is injected into the central nervous system.

14. The method of claim 12, wherein the IL-21/IL-21R agonist is injected
20 intrathecally or intravenously.

15. The method of claim 12, wherein the IL-21/IL-21R agonist is injected into the lumbar cerebrospinal fluid.

25 16. The method of 1, further comprising evaluating a subject for risk of multiple sclerosis by evaluating an IL-10 parameter of the subject.

17. The method of 1, further comprising, prior to the administering, evaluating an IL-10 parameter of the subject.

30

62

18. The method of 17, further comprising, after to the administering, evaluating an IL-10 parameter of the subject, wherein an increase in the IL-10 parameter indicates a therapeutic effect.

5 19. The method of 1, further comprising, after to the administering, evaluating an IL-10 parameter of the subject.

20. A pharmaceutical composition comprising an IL-21/IL-21R agonist and an anti-inflammatory agent, wherein said IL-21/IL-21R agonist is selected from the group
10 consisting of an IL-21 polypeptide, an agonistic anti-IL21R antibody and an antigen-binding fragment of an agonistic anti-IL21R antibody.

21. The pharmaceutical composition of claim 20, wherein the IL-21 polypeptide has a sequence at least 90% identical to the amino acid sequence of SEQ
15 ID NO:2 and is capable of binding to an IL-21R.

22. The pharmaceutical composition of claim 20, wherein the IL-21 polypeptide has a sequence at least 95% identical to the amino acid sequence of SEQ
ID NO:2 and is capable of binding to an IL-21R.

20.

23. The pharmaceutical composition of claim 20, wherein said IL-21/IL-21R agonist comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

24. The pharmaceutical composition of claim 20, wherein the anti-
25 inflammatory agent is selected from the group consisting of IFN β -1 α , IFN β -1 β , TNF antagonists, IL-12 antagonists, IL-23 antagonists, methotrexate, leflunomide, sirolimus (rapamycin), and CCI-779.

25. The pharmaceutical composition of claim 20, wherein the agonist is an
30 agonistic anti-IL21R antibody or an antigen-binding fragment thereof.

26. The pharmaceutical composition of claim 25, wherein the agonistic anti-IL21R antibody is a human antibody.

27. A pharmaceutical composition comprising an IL-21/IL-21R agonist and a
5 protein that simulates myelin basic protein, wherein said IL-21/IL-21R agonist is selected from the group consisting of an IL-21 polypeptide, an agonistic anti-IL21R antibody and an antigen-binding fragment of an agonistic anti-IL21R antibody.

28. The pharmaceutical composition of claim 27 wherein the IL-21/IL-21R
10 agonist is a protein that comprises an IL-21 polypeptide, and the protein that simulates myelin basic protein comprises glatiramer acetate.

29. A method of ameliorating multiple sclerosis in a mammalian subject, the method comprising:
15 administering to the subject an interleukin-21 (IL-21) polypeptide in an amount sufficient to ameliorate multiple sclerosis, or at least one symptom of multiple sclerosis in the subject.

30. The method of claim 29 wherein the subject is human, and the IL-21
20 polypeptide is a human IL-21 polypeptide.

31. The method of claim 30 wherein the IL-21 polypeptide comprises SEQ ID
NO:2.

25 32. The method of claim 30 wherein the IL-21 polypeptide is recombinantly produced.

33. The method of claim 30 wherein the IL-21 polypeptide is recombinantly
produced in a bacterial cell.

30

34. A method of modulating an IL-10 deficiency, or a disorder associated with an IL-10 deficiency in a mammalian subject, the method comprising:

administering to the subject an interleukin-21 (IL-21) polypeptide in an amount sufficient to increase IL-10 expression or activity in the subject.

35. A method of treating or preventing an immunological disorder in a mammalian subject, the method comprising:
evaluating an IL-10 parameter in a mammalian subject; and
administering, to the subject, an interleukin-21 (IL-21) polypeptide in an amount that is dependent on results of the evaluated IL-10 parameter.

36. The method of claim 35 wherein the IL-10 parameter comprises quantitative information about levels of IL-10 protein or IL-10 mRNA.

37. The method of claim 35 wherein the IL-10 parameter comprises quantitative information about levels of IL-10 protein activity.

38. The method of claim 35 wherein the immunological disorder is a neurological disorder.

39. The method of claim 38 wherein the subject is human and the immunological disorder is multiple sclerosis.

40. The method of claim 38 wherein the immunological disorder causes damage or alteration to myelin sheaths.

41. A method of evaluating treatment of multiple sclerosis in a mammalian subject, the method comprising:
administering, to the subject, an agonist of an interleukin-21 (IL-21)/IL-21 receptor (IL-21R); and
evaluating an IL-10 parameter in the subject.

20

42. The method of claim 41 further comprising administering to the subject a second dose of the agonist, wherein the second dose is administered as a function of the evaluated IL-10 parameter.

5 43. The method of claim 41 wherein the agonist is selected from the group consisting of an IL-21 polypeptide, an agonistic anti-IL21R antibody and an antigen-binding fragment of an agonistic anti-IL21R antibody.

44. The method of claim 43 wherein the agonist is an IL-21 polypeptide.

10

45. The method of claim 44 wherein the subject is human, and the IL-21 polypeptide is a human IL-21 polypeptide.

15 NO:2.

46. The method of claim 44 wherein the IL-21 polypeptide comprises SEQ ID

47. An article of manufacture comprising
(i) a container with one or more unit doses of a pharmaceutical composition comprising an IL-21 polypeptide; and
20 (ii) instructions for administering the unit doses to a subject that has, or is suspected of having, multiple sclerosis.

48. The article of 47 wherein the instructions are provided on a label.

25

49. The article of 48 wherein the label is affixed to an external surface of the container.

ABSTRACT

Methods and compositions for modulating interleukin-21 (IL-21)/IL-21 receptor (MU-1) activity using agonists of IL-21 or IL-21 receptor ("IL-21R" or "MU-1"), are disclosed. IL-21/IL-21R agonists can be used by themselves or in combination with
5 anti-inflammatory agents to treat, e.g., ameliorate, symptoms associated with immunological disorders of the nervous system, e.g., multiple sclerosis.

20829172 .doc

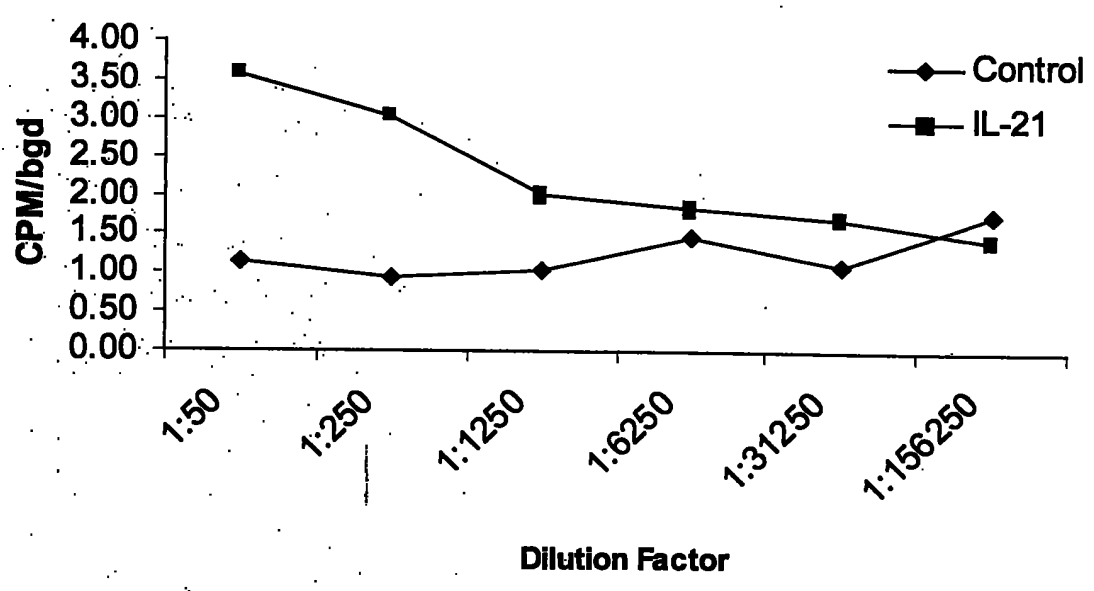
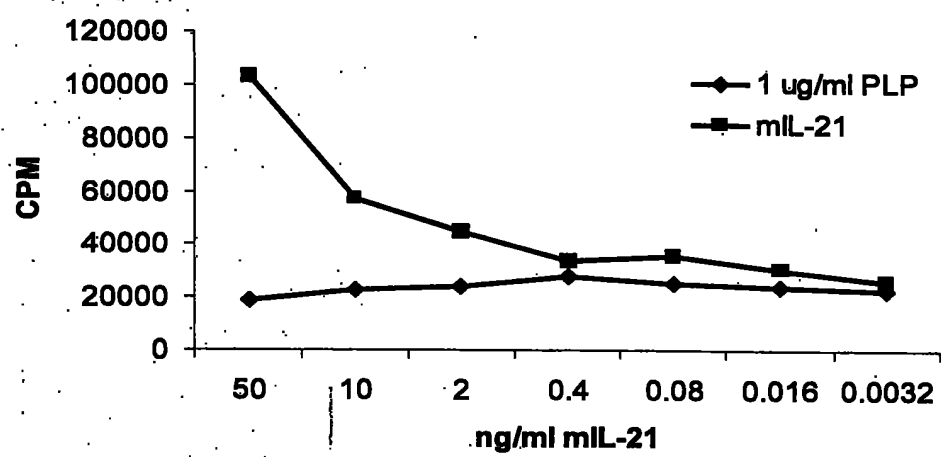
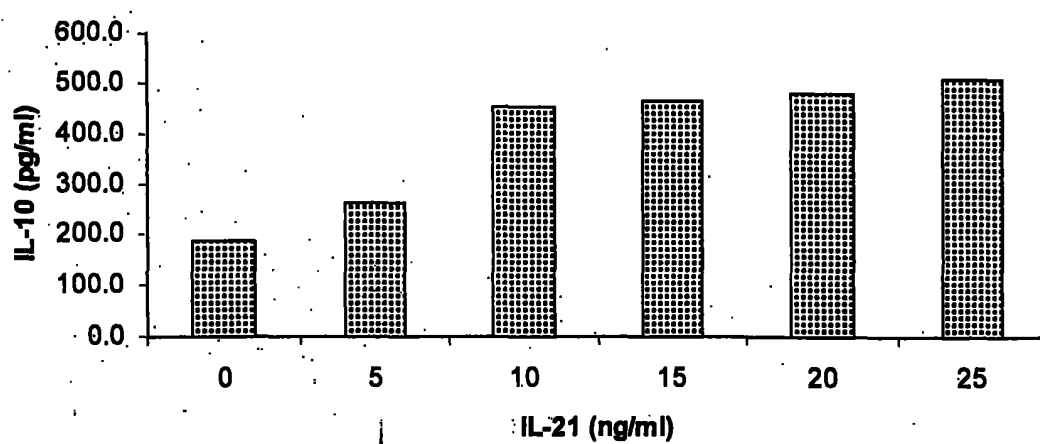


FIG. 1A

**FIG. 1B**

**FIG. 2**

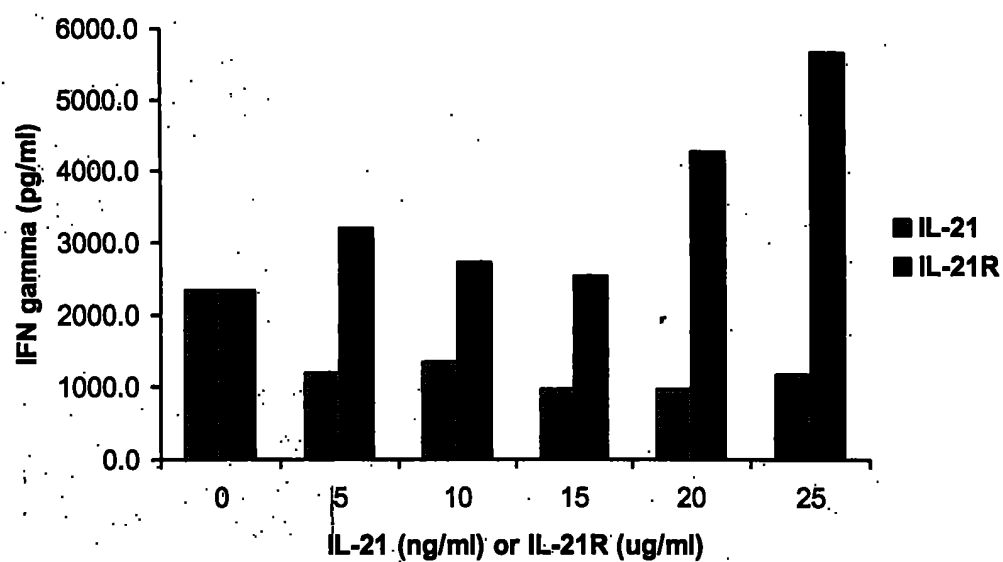


FIG. 3

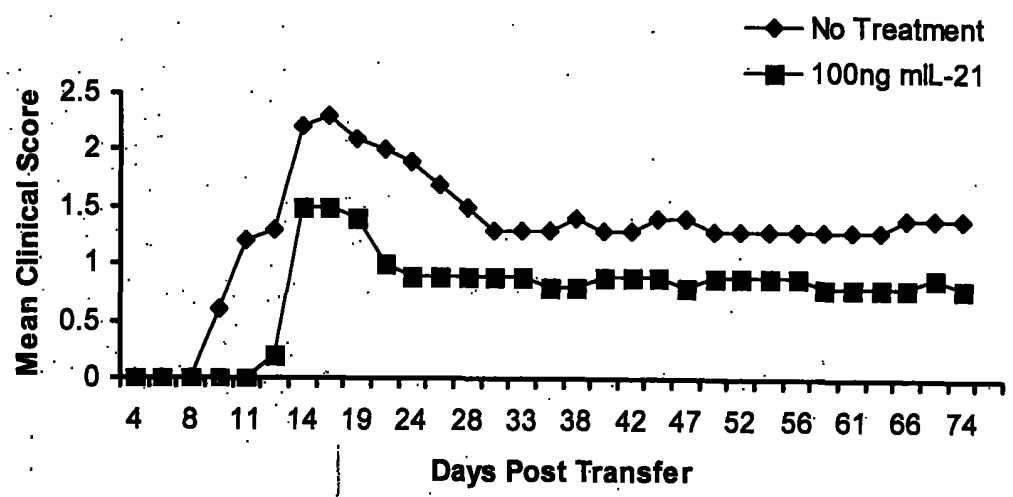


FIG. 4

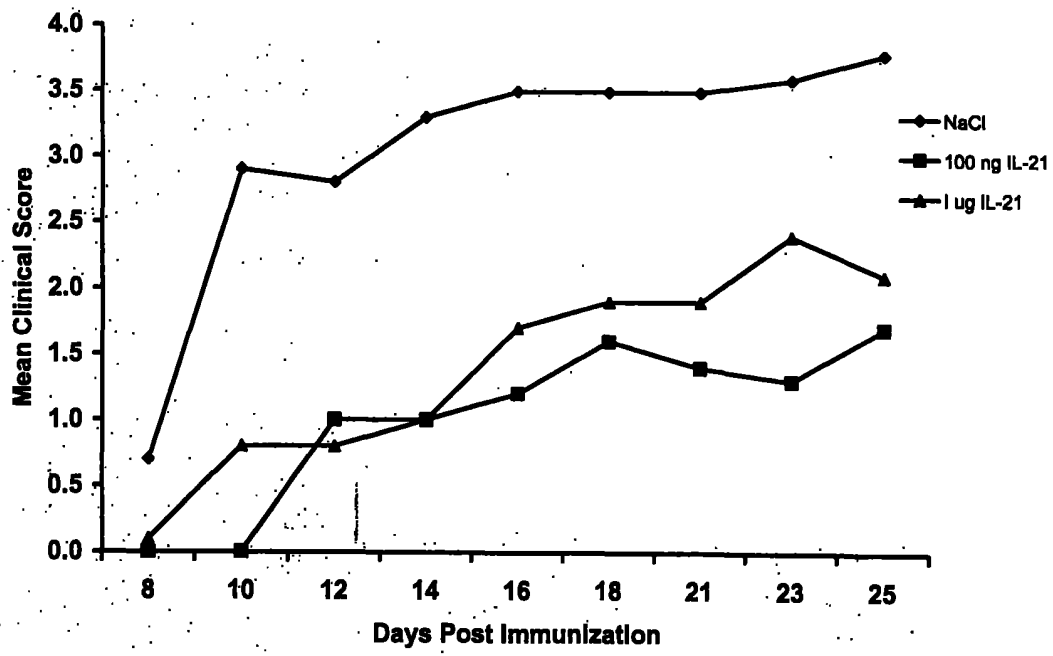


FIG. 5

SEQUENCE LISTING

<110> Wyeth

<120> TREATING IMMUNOLOGICAL DISORDERS USING AGONISTS OF
INTERLEUKIN-21/ INTERLEUKIN-21 RECEPTOR

<130> 16158-013W01

<150> US 60/456,920

<151> 2003-03-21

<160> 13

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 617

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtacttatga gatccagtcc      60
tggcaacatg gagaggattg tcatctgtct gatggtcac tcttgggga cactgggcc      120
caaatcaagc tccaagggtc aagatcgcca catgattaga atgcgtcaac ttatagatat      180
tgttgatcag ctgaaaaatt atgtgaatga cttgggccct gaatttctgc cagctccaga      240
agatgtagag acaaactgtg agtggtcagc ttttcctgc tttcagaagg cccaactaaa      300
gtcagcaaat acaggaaaca atgaaaggat aatcaatgta tcaattaaaa agctgaagag      360
gaaaccacct tccacaaatg cagggagaag acagaaacac agactaacat gcccttcacg      420
tgattcttat gagaaaaaac caccctaaaga attcctagaa agattcaant caattctcca      480
aaagatgatt catcagcacc tgtcctctag aacacacgga agtgaagatt cctgaggatc      540
taacttgcag ttggacacta tgttacatac tctaatatag tagtgaaagt catttctttg      600
tattccaagt ggaggag                                     617

```

<210> 2

<211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp
1           5           10           15

```

```

Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala
20           25           30

```

Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe
35 40 45

Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile
50 55 60

Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn
65 70 75 80

Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser
85 90 95

Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu
100 105 110

Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser
115 120 125

Glu Asp Ser
130

<210> 3
<211> 3072
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 3
gagaaccaga ccaaggccct gtcatcagct cctggagact cagttctggt ggcattggaga 60
ggacccttgt ctgtctggta gtcattcttct tggggacagt ggcccataaa tcaagccccc 120
aagggccaga tcgcctcctg attagacttc gtcaccttat tgacattggt gaacagctga 180
aatgtatga aaatgacttg gatcctgaac ttctatcagc tccacaagat gtaaaggggc 240
actgtgagca tgcagctttt gcctgttttc agaaggccaa actcaagcca tcaaaccctg 300
gaaacaataa gacattcatc attgacctcg tggccagct caggaggagg ctgcctgcc 360
ggaggggagg aaagaaacag aagcacatag ctaaagtccc ttcctgtgat tcgtatgaga 420
aaaggacacc caaagaattc ctagaagac taaaatggct cottcaaaag atgattcatc 480
agcatctctc ctagaacaca taggaccga agattcctga ggatccgaga agattccga 540
ggactgagga gacgccggac actatagacg ctacgaatg caggagtaca tcttgctct 600
tgggattgca agtggagaag tacgatacgt tatgataaga acaactcaga aaagctatag 660
gttaagatcc tttcgcccat taactaagca gacattgtgg ttcctgcac agactccatg 720
ctgtcaacat gaaaatctc aactcaaaa gagccagct tccgtgtca gggatttctg 780
gtgcttctca agctgtggct tcatttatt gcccaactgt gacattcttt gattggaagg 840

ggaaaactaa agcttttagc aaaaatacag ctagggaatt tgtcgatctg cgagagtaag 900
 acctcttatg atcctaacgg aatgatgtaa gctggaaata ataagcataa gatgaaattg 960
 aaaattgaag tctttattct ttaagaaaaa ctttgtactt gaaagcatgt ctgaagagtt 1020
 tactcattac cacaaacatc tagcatattg ataactaaca tctttatact ctacaagaga 1080
 ggctttccag ataggtagcag tttttcttct ctattaggtc tatcaaaatt taacctatta 1140
 tgagggtcac ccctggcttt cactgttttt ctaaagaggc aagggtgtag taagaagcag 1200
 gcttaagttg ccttcctccc aatgtcaagt tcctttataa gctaataggt taatcttggt 1260
 aagatggcaa tgaaagcctg tggaagtgc aacctacta tcttctggag ccaagtagaa 1320
 ttttcaagtt tgtagctctc acctcaagtg gttatgggtg tcctgtgatg aatctgctag 1380
 ctccagcctc agtctcctct cccacatcct ttcctttctt tcctctttga aacttctaag 1440
 aaaaagcaat ccaacaagt tcagcactta agacacattg catgcacact tttgataagt 1500
 taaatccaac catctattta aaatcaaaat caggagatga gccaaagagac cagagggttct 1560
 gttccagttt taaacagact tttactgaac atcccaatct ttttaaccaca gaggctaaat 1620
 tgagcaaata gttttgcat ttgatataat ttccaacagt atgtttcaat gtcaagttaa 1680
 aaagtctaca aagctatttt ccctggagtg gtatcatcgc tttgagaatt tcttatgggt 1740
 aaaatggatc tgagatccaa gcatggcctg ggggatgggt ttgatctaag gaaaaagggtg 1800
 tctgtacctc acagtgcctt taaaacaagc agagatcccg tgtaccgccc taagatagca 1860
 cagactagtg ttaactgatt cccagaaaag tgtcacaatc agaaccaacg cattctctta 1920
 aactttaaaa atatgtattg caaagaactt gtgtaactgt aaatgtgtga ctgttgatga 1980
 cattatacac acatagccca cgtaagtgtc caatgggtgct agcattgggt gctgagtttg 2040
 ctgctcgaag gctgaagcag agatgcagtc cttcacaaag caatgatgga cagagagggg 2100
 agtctccatg ttttattctt ttgttgtttc tggctgtgta actgttgact tcttgacatt 2160
 gtgattttta tatttaagac aatgtattta ttttgggtgtg tttattgttc tagcctttta 2220
 aatcactgac aatttctaata caagaagtac aaataattca atgcagcaca ggctaagagc 2280
 ttgtatcggt tggaaaagcc agtgaaggct tctccactag ccatgggaaa gctacgcttt 2340
 agagtaaact agacaaaatt gcacagcagt cttgaacctc tctgtgctca agactcagcc 2400
 agtcctttga cattattggt cactgtgggt gggaacacat tggacctgac aactgttgt 2460
 gtgtccatga aggttgccac tgggtgaagc ttttttggt tttcattctc ttatctgtag 2520
 aacaagaatg tggggctttc ctaagtctat tctgtatttt attctgaact tcgtatgtct 2580
 gagttttaat gttttgagta ctcttacagg aacacctgac cacacttttg agttaaat 2640

tatcccaagt gtgatattta gttgttcaaa aaggggaagg atatacatat atacatacat 2700
 acatacatat atatatatat atatatatat atatatatat gtatatatat 2760
 atatatatag agagagagag agagagagag agagaaagag agagagggtg ttgtagggtca 2820
 taggagttca gaggaaatca gttatggccg ttaatactgt agctgaaagt gttttctttg 2880
 tgaataaatt catagcatta ttgatctatg ttattgctct gttttattta cagtcacacc 2940
 tgagaattta gttttaatat gaatgatgta ctttataact taatgattat ttattatgta 3000
 tttggttttg aatgtttgtg ttcatggctt cttatttaag acctgatcat attaaatgct 3060
 acccagtcgg ga 3072

<210> 4
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu Arg His Leu Ile Asp Ile Val Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp Leu Asp Pro Glu Leu Leu Ser Ala
 20 25 30

Pro Gln Asp Val Lys Gly His Cys Glu His Ala Ala Phe Ala Cys Phe
 35 40 45

Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser Asn Pro Gly Asn Asn Lys Thr Phe
 50 55 60

Ile Ile Asp Leu Val Ala Gln Leu Arg Arg Arg Leu Pro Ala Arg Arg
 65 70 75 80

Gly Gly Lys Lys Gln Lys His Ile Ala Lys Cys Pro Ser Cys Asp Ser
 85 90 95

Tyr Glu Lys Arg Thr Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu
 100 105 110

Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser
 115 120

<210> 5
 <211> 2665
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5

gtcgactggg	ggcccagctg	cccgtcatca	gagtgacagg	tcttatgaca	gcctgattgg	60
tgactcgggc	tgggtgtgga	ttctcacccc	aggcctctgc	ctgctttctc	agaccctcat	120
ctgtcacccc	cacgctgaac	ccagctgcc	ccccagaag	cccatcagac	tgcccccagc	180
acacggaatg	gatttctgag	aaagaagccg	aaacagaagg	cccgtgggag	tcagcatgcc	240
gcgtggctgg	gccgccccct	tgtccctgct	gctgctccag	ggaggctggg	gctgccccga	300
cctcgtctgc	tacaccgatt	acctccagac	ggcatctctgc	atcctggaaa	tgtggaacct	360
ccaccccagc	acgctcacc	ttacctggca	agaccagtat	gaagagctga	aggacgaggc	420
cacctcctgc	agcctccaca	ggtcggccca	caatgccacg	catgccacct	acacctgcc	480
catggatgta	ttccacttca	tggccgacga	cattttcagt	gtcaacatca	cagaacagtc	540
tggcaactac	tcccaggagt	gtggcagctt	tctcctggct	gagagcatca	agccggctcc	600
ccctttcaac	gtgactgtga	ccttctcagg	acagtataat	atctcctggc	gctcagatta	660
cgaagaccct	gccttctaca	tgctgaagg	caagcttcag	tatgagctgc	agtacaggaa	720
ccggggagac	ccctgggctg	tgagtccgag	gagaaagctg	atctcagtgg	actcaagaag	780
tgtctccctc	ctccccctgg	agttccgcaa	agactcgagc	tatgagctgc	aggtgcgggc	840
agggcccatg	cctggctcct	cctaccagg	gacctggagt	gaatggagt	acccggcat	900
ctttcagacc	cagtcagagg	agttaaagga	aggctggaac	cctcacctgc	tgcttctcct	960
cctgcttgtc	atagtcttca	ttcctgcctt	ctggagcctg	aagaccatc	cattgtggag	1020
gctatggaag	aagatatggg	ccgtccccag	ccctgagcgg	ttcttcatgc	ccctgtacaa	1080
gggctgcagc	ggagacttca	agaaatgggt	gggtgcaccc	ttactggct	ccageetgga	1140
gctgggaccc	tggagcccag	aggtgccctc	cacctggag	gtgtacagct	gccacccacc	1200
acggagcccc	gccaagaggc	tgcagctcac	ggagctacaa	gaaccagcag	agctgggtga	1260
gtctgacggg	gtgccaagc	ccagcttctg	gccgacagcc	cagaactcgg	ggggctcagc	1320
ttacagtgag	gagagggatc	ggccatacgg	cctgggtgtcc	attgacacag	tgactgtgct	1380
agatgcagag	gggcatgca	cctggccctg	cagctgtgag	gatgacggct	acccagccct	1440
ggacctggat	gctggcctgg	agcccagccc	aggcctagag	gaccactct	tggatgcagg	1500
gaccacagtc	ctgtcctgtg	gctgtgtctc	agctggcagc	cctgggctag	gagggcccct	1560
gggaagcctc	ctggatagac	taaagccacc	ccttgcagat	ggggaggact	gggctggggg	1620
actgccctgg	ggtggccggt	cacctggagg	ggtctcagag	agtgaggcgg	gctcacccct	1680
ggccggcctg	gatatggaca	cgtttgacag	tggctttgtg	ggctctgact	gcagcagccc	1740
tgtggagtgt	gacttcacca	gccccgggga	cgaaggaccc	ccccggagct	acctccgcca	1800

gtgggtggtc attcctccgc cactttcgag ccctggaccc caggccagct aatgaggctg 1860
 actggatgtc cagagctggc caggcoactg ggccctgagc cagagacaag gtcacctggg 1920
 ctgtgatgtg aagacacctg cagcctttgg tctcctggat gggcctttga gcctgatgtt 1980
 tacagtgtct gtgtgtgtgt gtgcatatgt gtgtgtgtgc atatgcatgt gtgtgtgtgt 2040
 gtgtgtctta ggtgcgcagt ggcattgtcca cgtgtgtgtg tgattgcacg tgccctgtggg 2100
 cctgggataa tgcccatggg actccatgca ttcacctgcc ctgtgcatgt ctggactcac 2160
 ggagctcacc catgtgcaca agtgtgcaca gtaaactgtt ttgtgggtcaa cagatgacaa 2220
 cagccgtcct ccctcctagg gtcttgtgtt gcaagttggg ccacagcatc tccggggctt 2280
 tgtgggatca gggcattgcc tgtgactgag gcggagccca gccctccagc gtctgcctcc 2340
 aggagctgca agaagtccat attgttcctt atcacctgcc aacaggaagc gaaaggggat 2400
 ggagtgaacc catggtgacc tcgggaatgg caattttttg ggcggcccct ggacgaaggt 2460
 ctgaatcccg actctgatac cttctggctg tgctacctga gccaaagtcgc ctcccctctc 2520
 tgggctagag tttccttatc cagacagtgg ggaaggcatg acacacctgg gggaaattgg 2580
 cgatgtcacc cgtgtacggg acgcagccca gagcagaccc tcaataaacg tcagcttctc 2640
 tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ctaga 2665

<210> 6
 <211> 538
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

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

85

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> 7

<211> 2628

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 7

gtcgcgcgcg cggtaccagc tgtctgccca cttctcctgt ggtgtgcctc acggtcactt 60

gcttgtctga ccgcaagtct gcccatccct ggggcagcca actggcctca gcccggtccc 120

cagggctgcc ctgtctctgt ctggctgccc cagccctact gtcttcctct gtgtaggctc	180
tgcccagatg cccggctggc cctcagcctc aggactatct cagcagtgac tcccctgatt	240
ctggacttgc acctgactga actcctgccc acctcaaacc ttcacctccc accaccacca	300
ctccgagtcc cgctgtgact cccacgccc ggagaccacc caagtgcccc agcctaaaga	360
atggctttct gagaaagacc ctgaaggagt aggtctggga cacagcatgc cccggggccc	420
actggctgcc ttactcctgc tgattctcca tggagcttgg agctgcctgg acctcacttg	480
ctacactgac tacctctgga ccatcacctg tgtcctggag acaeggagcc ccaaccccag	540
catactcagt ctcacctggc aagatgaata tgaggaactt caggaccaag agaccttctg	600
cagcctacac aggtctggcc acaacaccac acatatatgg tacacgtgcc atatgcgctt	660
gtctcaattc ctgtccgatg aagttttcat tgtcaatgtg acggaccagt ctggcaacaa	720
ctcccaagag tgtggcagct ttgtcctggc tgagagcatc aaaccagctc cccccttgaa	780
cgtgactgtg gccttctcag gacgctatga tatctcctgg gactcagctt atgacgaacc	840
ctccaactac gtgctgaggg gcaagctaca atatgagctg cagtatcgga acctcagaga	900
cccctatgct gtgaggccgg tgaccaagct gatctcagtg gactcaagaa acgtctctct	960
tctccctgaa gagttccaca aagattctag ctaccagctg caggtgcggg cagcgctca	1020
gccaggcact tcattcaggg ggacctggag tgagtggagt gaccccgta tctttcagac	1080
ccaggctggg gagcccgagg caggctggga ccctcacatg ctgctgctcc tggctgtctt	1140
gatcattgtc ctggttttca tgggtctgaa gatccacctg ccttggaggc tatggaaaaa	1200
gatatgggca ccagtgccca cccctgagag tttcttccag cccctgtaca gggagcacag	1260
cgggaaactc aagaaatggg ttaatacccc tttcacggcc tccagcatag agttggtgcc	1320
acagagttcc acaacaacat cagccttaca tctgtcattg tatccagcca aggagaagaa	1380
gttcccgggg ctgccgggtc tggaagagca actggagtgat gatggaatgt ctgagcctgg	1440
tcactggtgc ataatccct tggcagctgg ccaagcggtc tcagcctaca gtgaggagag	1500
agaccggcca tatggtctgg tgtccattga cacagtgact gtgggagatg cagagggcct	1560
gtgtgtctgg ccctgtagct gtgaggatga tggctatcca gccatgaacc tggatgctgg	1620
ccgagagtct ggccctaatt cagaggatct gctcttggtc acagaccctg cttttctgtc	1680
ttgcggctgt gtctcaggta gtggtctcag gcttggaggc tcccaggca gcctactgga	1740
caggttgagg ctgtcatttg caaaggaagg ggactggaca gcagaccaa cctggagaac	1800
tgggtcccca ggagggggct ctgagagtga agcaggttcc cccctggtc tggacatgga	1860
cacatttgac agtggcttg caggttcaga ctgtggcagc cccgtggaga ctgatgaagg	1920

accccctcga agctatctcc gccagtgggt ggtcaggacc cctccacctg tggacagtgg 1980
 agcccagagc agctagcata taataaccag ctatagttag aagaggcctc tgagcctggc 2040
 atttacagtg tgaacatgta ggggtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 2100
 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtcttgggt tgtgtgttag cacatccatg ttgggatttg 2160
 gtctgttgct atgtattgta atgctaaatt ctctacccaa agttctaggc ctacgagtga 2220
 attctcatgt ttacaaactt gctgtgtaaa ccttgttctt taatttaata ccattggtta 2280
 aataaaattg gctgcaacca attactggag ggattagagg tagggggcctt ttgagttacc 2340
 tgtttggaga tggagaagga gagaggagag accaagagga gaaggaggaa ggagaggaga 2400
 ggagaggaga ggagaggaga ggagaggaga ggagaggaga ggagaggaga ggctgccgtg 2460
 aggggagagg gaccatgagc ctgtggccag gagaaacagc aagtatctgg ggtacactgg 2520
 tgaggaggtg gccaggccag cagttagaag agtagattag gggtgacctc cagtatttgt 2580
 caaagccaat taaaataaca aaaaaaaaaa aaaagcggcc gctctaga 2628

<210> 8
 <211> 529
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8

Met Pro Arg Gly Pro Val Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ile Leu His Gly
1 5 10 15

Ala Trp Ser Cys Leu Asp Leu Thr Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr
20 25 30

Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser
35 40 45

Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr Glu Glu Leu Gln Asp Gln Glu Thr Phe
50 55 60

Cys Ser Leu His Arg Ser Gly His Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr
65 70 75 80

Cys His Met Arg Leu Ser Gln Phe Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val
85 90 95

Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly Asn Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe
100 105 110

Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val

115

120

125

Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu
130 135 140

Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr
145 150 155 160

Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile
165 170 175

Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys
180 185 190

Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Val Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr
195 200 205

Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln
210 215 220

Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala Gly Trp Asp Pro His Met Leu Leu
225 230 235 240

Leu Leu Ala Val Leu Ile Ile Val Leu Val Phe Met Gly Leu Lys Ile
245 250 255

His Leu Pro Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp Ala Pro Val Pro Thr
260 265 270

Pro Glu Ser Phe Phe Gln Pro Leu Tyr Arg Glu His Ser Gly Asn Phe
275 280 285

Lys Lys Trp Val Asn Thr Pro Phe Thr Ala Ser Ser Ile Glu Leu Val
290 295 300

Pro Gln Ser Ser Thr Thr Thr Ser Ala Leu His Leu Ser Leu Tyr Pro
305 310 315 320

Ala Lys Glu Lys Lys Phe Pro Gly Leu Pro Gly Leu Glu Glu Gln Leu
325 330 335

Glu Cys Asp Gly Met Ser Glu Pro Gly His Trp Cys Ile Ile Pro Leu
340 345 350

Ala Ala Gly Gln Ala Val Ser Ala Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro
355 360 365

Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val Thr Val Gly Asp Ala Glu Gly
370 375 380

Leu Cys Val Trp Pro Cys Ser Cys Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Met
385 390 395 400

Asn Leu Asp Ala Gly Arg Glu Ser Gly Pro Asn Ser Glu Asp Leu Leu
405 410 415

Leu Val Thr Asp Pro Ala Phe Leu Ser Cys Gly Cys Val Ser Gly Ser
420 425 430

Gly Leu Arg Leu Gly Gly Ser Pro Gly Ser Leu Leu Asp Arg Leu Arg
435 440 445

Leu Ser Phe Ala Lys Glu Gly Asp Trp Thr Ala Asp Pro Thr Trp Arg
450 455 460

Thr Gly Ser Pro Gly Gly Gly Ser Glu Ser Glu Ala Gly Ser Pro Pro
465 470 475 480

Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp Ser Gly Phe Ala Gly Ser Asp Cys
485 490 495

Gly Ser Pro Val Glu Thr Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg
500 505 510

Gln Trp Val Val Arg Thr Pro Pro Pro Val Asp Ser Gly Ala Gln Ser
515 520 525

Ser

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 9

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

<210> 10
<211> 162
<212> PRT
<213> Homo sapiens

90

<400> 10

Met Arg Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met
 1 5 10 15

Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln
 20 25 30

Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln
 35 40 45

Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro
 50 55 60

Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln
 65 70 75 80

Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile
 85 90 95

Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala
 100 105 110

Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr
 115 120 125

Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu
 130 135 140

Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu
 145 150 155 160

Asp Ser

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic linker

<400> 11

Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 12
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Bos taurus

<400> 12

Gln Asp Arg Leu Phe Ile Arg Leu Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Asp Pro Glu Phe Leu Pro Ala
 20 25 30

Pro Glu Asp Val Lys Arg His Cys Glu Arg Ser Ala Phe Ser Cys Phe
 35 40 45

Gln Lys Val Gln Leu Lys Ser Ala Asn Asn Gly Asp Asn Glu Lys Ile
 50 55 60

Ile Asn Ile Leu Thr Lys Gln Leu Lys Arg Lys Leu Pro Ala Thr Asn
 65 70 75 80

Thr Gly Arg Arg Gln Lys His Glu Val Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser
 85 90 95

Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Tyr Leu Glu Arg Leu Lys Ser Leu
 100 105 110

Ile Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser
 115 120

<210> 13
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 13

Met Glu Arg Thr Leu Val Cys Leu Val Val Ile Phe Leu Gly Thr Val
 1 5 10 15

Ala His Lys Ser Ser Pro Gln Gly Pro Asp Arg Leu Leu Ile Arg Leu
 20 25 30

Arg His Leu Ile Asp Ile Val Glu Gln Leu Lys Ile Tyr Glu Asn Asp
 35 40 45

Leu Asp Pro Glu Leu Leu Ser Ala Pro Gln Asp Val Lys Gly His Cys
 50 55 60

Glu His Ala Ala Phe Ala Cys Phe Gln Lys Ala Lys Leu Lys Pro Ser
 65 70 75 80

Asn Pro Gly Asn Asn Lys Thr Phe Ile Ile Asp Leu Val Ala Gln Leu
 85 90 95

Arg Arg Arg Leu Pro Ala Arg Arg Gly Gly Lys Lys Gln Lys His Ile
 100 105 110

Ala Lys Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Arg Thr Pro Lys Glu
 115 120 125

Phe Leu Glu Arg Leu Lys Trp Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His
 130 135 140

Leu Ser
 145

TRATAR DESORDEN INMUNOLÓGICO USANDO AGONISTAS DE
INTERLEUCINA – 21/RECEPTOR DE INTERLEUCINA – 21

REFERENCIAS CRUZADAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama prioridad de la solicitud Estadounidense serie No. 60/456,920, presentada en marzo 21, 2003, cuyos contenidos se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con métodos y composiciones para tratar o prevenir desordenes inmunológicos del sistema nervioso, por ejemplo, esclerosis múltiple, usando agonistas de IL-21 /receptor IL-21, por ejemplo, un polipéptido de IL-21 o un fragmento activo del mismo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El IL-21 humano es una citosina. En su forma madura, el tiene cerca de 131 aminoácidos en longitud y tiene una homología de secuencia con respecto a IL-2, IL-4 e IL-15 (Parrish-Novak *et al.*(2000) *Nature* 408:57-63). A pesar de la baja homología en secuencia entre la citosina de interleucina, estas citocinas comparten una característica común que incluye una estructura característica de "Manojo de cuatro hélices". La mayoría de las citocinas se ligan en receptores citosina de la clase I o de la clase II. Los receptores de citosina de la clase II incluye los receptores para IL-10 y los interferones, mientras que los receptores de

citocina de clase I incluyen los receptores para IL-2, IL-7, IL-9, IL-11-13 e IL-15, lo mismo factores hematopoyéticos de crecimiento, leptina y hormona de crecimiento (Cosman, D.(1993) *Citocinas* 5:95-106).

La IL-21R humana es un receptor de citosina clase I que está expresado por células linfoides, particularmente por NK, B y células T (Parrish-Novak *et al.* (2000) *supra*). Las secuencias de ácido nucleico ilustrativas que codifican la interleucina -21 humana (IL-21) y su receptor (IL-21R) se describen en la WO 00/53761, WO 01/85792, Parrish-Novak *et al.* (2000) *supra*, y Ozaki *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:11439-11444, ya que son la secuencia de renovación correspondiente. La IL-21R muestra una homología alta de secuencia a la IL-2 en la cadena β del receptor y en la cadena α del receptor IL-4 (Ozaki *et al.* (2000) *supra*). Luego de ligar el ligando, el IL-21R se asocia con la cadena del receptor de citosina gama común (γc) es compartida por receptores para IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13 e IL-15 (Ozaki *et al.* (2000) *supra*; Asao *et al.* (2001) *J. Immunol.* 167:1-5). La amplia distribución de linfoides de la IL-21R sugiere que IL-21 juega un papel en la regulación inmune. De hecho, los estudios *in Vitro* han notado que la IL-21 modula significativamente la función de las células B, las células CD4⁺ y las células T CD8⁺, y las células NK (Parrish-novak *et al.* (2000) *Supra*; Kasaian, M.T. *et al.* (2002) *Immunity.* 16:559-569). Parrish-Novak *et al.* (2000) sugirió en la funciones de IL-21 activado a estimular proliferación y maduración de las células asesinas naturales (NK), la proliferación de las poblaciones de células B maduras co-estimuladas con anti-CD40, y la proliferación de células T co-estimuladas con anti-CD3.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se describen métodos y composiciones para incrementar la actividad de, y/o una interacción entre, una interleucina -21 (IL-21) y un receptor IL-21 (También definido aquí como "IL-21R" o "MU-1") usando agonistas IL-21 o IL-21R (También referidos aquí como agonistas "IL-21/IL-21R" o "agonistas"). Tales métodos de composiciones pueden ser usados para modular en desorden inmunológico del sistema nervioso o una enfermedad o desorden asociado con deficiencia de IL-10. por ejemplo, los métodos y composiciones pueden ser usados para tratar o impedir la esclerosis múltiple (MS).

Hemos mostrado, por ejemplo, que el tratamiento en ratones profilácticamente con una agonista IL-21/IL-21R, por ejemplo, polipéptido de murina de IL-21, resulta de un mejoramiento de los síntomas de modelo de ratón para encéfalo mielitis auto inmune experimental (EAE). La modulación de los síntomas de EAE fue detectada en modelos de ratón generados usando Glicoproteína de melina de oligodendrocito (MOG) que es un péptido (Por ejemplo MOG 35-55) y la proteína proteolípida (PLP; ejemplo, PLP 139-151). IL-21 indujo proliferación de las células T *in Vitro*. Los lifonцитos cultivados en la presencia de IL-21 produjeron cantidades incrementadas de IL-10 y modelos disminuidos de interferón γ (IFN- γ). De acuerdo a lo anterior, los agonistas de IL-21/IL-21R en su actividad deben ser usados profiláctica o terapéuticamente para tratar desordenes inmunológicos del sistema nervioso (por ejemplo, desordenes crónicos inmunológicos del sistema nervioso, incluyendo la esclerosis múltiple).

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención caracteriza un método para tratar (por ejemplo, curar, suprimir, mejorar, reducir y retardar) o

impedir (por ejemplo prevenir el establecimiento de, o prevenir la recurrencia o relapso de ese) un desorden inmunológico del sistema nervioso (por ejemplo un desorden crónico inmunológico del sistema nervioso incluyendo esclerosis múltiple), en un sujeto. El método incluye : administrar al sujeto un agonistas de IL-21/IL-21R, en una cantidad suficiente para modular la actividad celular inmune y/o numero (por ejemplo, para modular niveles de citosina, por ejemplo expresión de citosina, producción y/o liberación), tratando así o previniendo el desorden inmunológico del sistema nervioso, por ejemplo, la esclerosis múltiple. en una modalidad, el agonista IL-21/IL-21R es administrado antes del establecimiento de los síntomas para, por ejemplo, retardar o impedir el establecimiento de, o impedir la recurrencia o relapso de, los síntomas. Por ejemplo, el agonista de IL-21/IL-21R puede ser administrado cuando un sujeto, por ejemplo, un paciente MS, esta en su remisión. En otra modalidad el agonista IL-21/IL-21R es administrado después del establecimiento de los síntomas o durante un ataque. Los síntomas generales y los activos de MS incluyen temblor, coordinación pobre, dificultad en el caminado, y otros problemas.

El agonista IL-21/IL-21R puede ser administrado en sujeto, solo o en combinación, con otras modalidades terapéuticas como se describe aquí. Preferiblemente, el sujeto es un mamífero, por ejemplo, un humano que sufre de un desorden inmunológico del sistema nervioso, por ejemplo, esclerosis múltiple.

En una modalidad, el agonista IL-21/IL-21R interactúan con, por ejemplo, se liga a, IL-21 o IL-21R, preferiblemente, de mamíferos, por ejemplo IL-21 o IL-21R humano, e incrementa la potencia una o mas actividades del IL-21 y/o IL-21R. Un agonista de IL-21 se ha referido aquí como un "agonista IL-21", y un agonista de IL-21R se ha llamado como un "agonista IL-21R". Un polipéptido IL-21 es en si

mismo un agonista IL-21R. Los agonistas preferidos serian IL-21 o IL-21R con una alta afinidad, por ejemplo, con una afinidad constante de por lo menos cerca de 10^7M^{-1} , preferiblemente cerca de 10^8M^{-1} , y mas preferiblemente, cerca de 10^9M^{-1} a 10^{10}M^{-1} o mas fuerte. El agonista IL-21/IL-21R puede ser, por ejemplo, un polipéptido de IL-21 o un fragmento activo del mismo, una proteína de fusión de IL-21, un agonista péptido, un agonista de anticuerpo o un fragmento de ligado de antígeno, del mismo o un agonista de moléculas de pequeño.

En una modalidad, los agonista IL-21/IL-21R es un polipéptido de IL-21, por ejemplo, un polipéptido humano, bovino o de murina IL-21, un fragmento activo del mismo (por ejemplo, un polipéptido humano de IL-21 que comprende la secuencia de aminoácido usada como ID de SEC. No. 2, o codificada por una secuencia de nucleótidos usadas como ID de SEC. No. 1, o una secuencia de por lo menos 85%, 90%, 95%, 98% o mas idéntica a ella). En otra modalidad, el agonista IL-21/IL-21R es un polipéptido de murina de IL-21 o un fragmento activo del mismo (por ejemplo, un polipéptido de IL-21 de murina que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada como ID de SEC. No. 4, o codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada como ID de SEC. No. 3, o una secuencia de por lo menos 85%, 90%, 95%, 98% o mas idéntica a ella). En todavía otras modalidades, el agonista IL-21/IL-21R es una proteína de fusión que comprende un polipéptido de IL-21, por ejemplo, polipéptido humano y de murina o un fragmento del mismo y, por ejemplo, fusionado a una segunda parte, por ejemplo, un polipéptido (por ejemplo, un GST; una secuencia de polipéptido lex-A, una secuencia de polipéptido MBP o una cadena de inmunoglobulina, incluyendo, por ejemplo, un fragmento Fc, unas reacciones constantes de cadena pesada de diversos isótopos, incluyendo: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IIA1, IgA2, IgD, y IgE); un anticuerpo agonista o fragmento que liga al antígeno el mismo, que se liga al

receptor de IL-21; o una molécula pequeña o agonista péptido. en otras modalidades, el agonista IL-21/IL-21R es un agente que incrementa la activadas con niveles de IL-21 por, por ejemplo, una expresión incrementada, procesamiento y/o secreción de IL-21 funcional, los ácidos nucleicos que codifican los agonista IL-21/IL-21R anteriormente mencionados pueden también ser administrados al sujeto.

Las proteínas de fusión pueden adicionalmente incluir una secuencia enlazadora que une la primera parte, por ejemplo, un fragmento de IL-21 a una segunda parte, por ejemplo, un fragmento de inmunoglobulina. En otras modalidades, las secuencias de aminoácidos adicionales pueden ser agregadas al N- o C- terminal de la proteína de fusión para facilitar la expresión, la flexibilidad esterita, la detención y/o aislamiento de purificación.

Los agonistas de IL-21/IL-21R descritos aquí, por ejemplo, el polipéptido de IL-21 o una proteína de fusión descrita aquí, pueden ser derivados o envasados a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento de Fab'). Por ejemplo, la proteína de fusión o un anticuerpo, o una porción que liga al antígeno, puede ser enlazadas funcionalmente (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genérica, asociación no covalente o de otra manera) a uno o mas de otras entidades moleculares, tales como un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico), toxinas, radio isótopos, agentes citotóxicos o citoestáticos, entre otros.

En otra modalidad, el agonista de IL-21/IL-21R es un anticuerpo como por ejemplo, un anticuerpo agonístico, un fragmento que liga al antígeno del mismo, IL-21R, preferiblemente, IL-21R humano. El anticuerpo o fragmento que liga el

antígeno del mismo, puede ser un anticuerpo humanizado, genérico, humano (Por ejemplo, generado in Vitro), o un fragmento que ligue al antígeno del mismo. En una modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, por ejemplo, un anticuerpo que interactúan con IL-21R y otra cadena receptora.

En una modalidad el método incluye evaluar el sujeto en cuanto a un parámetro de IL-10. Un "parámetro de IL-10" es información cualitativa o cuantitativa acerca de niveles de IL-10 o actividad de IL-10, por ejemplo, mRNA y de IL-10, o niveles de proteínas o actividad. La información puede incluir, por ejemplo, concentración de IL-10 en uno o más tejidos o una o más muestras de un sujeto. El sujeto puede ser evaluado, por ejemplo, antes de administrar, por ejemplo, por lo menos, antes de administrar una primera dosis. El sujeto puede ser evaluado, por ejemplo, después de administrar, por ejemplo, después de administrar una o más dosis, por ejemplo a intervalos regulares, o en el caso de administración continua, después de uno o más intervalos. El sujeto puede ser evaluado tanto antes como después de una administración. La información de evaluar un parámetro de IL-10 puede ser usada para modular la administración de la agonista de IL-21/IL-21R. Por ejemplo, un incremento en un parámetro IL-10 a un valor en el rango en normal puede indicar un efecto terapéutico deseado. Una disminución en un parámetro IL-10 puede indicar insuficiente administración o un no respuesta. Similarmente, es posible evaluar un parámetro IFN γ correspondiente. En tales casos, una disminución en el parámetro OFN γ a un valor en el rango de normal puede indicar que un efecto terapéutico deseado. Un incremento en un parámetro IFN γ puede indicar administración insuficiente o que no hubo respuesta. Todavía otro parámetro que puede ser evaluado en relación con otras citosina factores suministrados en la tabla 3.

100

En una modalidad, el método incluye evaluar el sujeto en cuanto a un riesgo de un desorden inmunológico del sistema nervioso (Por ejemplo, esclerosis múltiple), o uno o más síntomas de tal desorden. Métodos de evaluar el riesgo incluyen evaluar un parámetro de IL-10.

En una implementación, el agonista IL-21/IL-21R es administrado en respuesta a una alteración en el estado de un sujeto, por ejemplo, en respuesta a un inicio o ataque asociado con MS.

Los antagonistas IL-21/IL-21R pueden ser administrados en la forma de una dosis única, o una serie de dosis separadas por intervalos de días, semanas o meses. Los agonistas IL-21/IL-21R pueden ser administrados por inyección, por ejemplo, por inyección en el sistema nervioso central, de un sujeto. Por ejemplo, los agonistas IL-21/IL-21R pueden ser inyectados dentro del fluido cerebroespinal lumbar (intratéticamente). En otras modalidades, los agonistas IL-21/IL-21R se administran intravenosamente.

En una modalidad, los agonistas IL-21/IL-21R descritos aquí, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas, son administrados en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes, por ejemplo, agentes terapéuticos, que son útiles para tratar o impedir un desorden inmunológico del sistema nervioso, por ejemplo, esclerosis múltiple. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir uno o más agonistas IL-21/IL-21R, por ejemplo, un polipéptido IL-21 o un fragmento activo del mismo, una proteína de fusión IL-21, un agonista de péptido, un agonista de anticuerpo, o una molécula agonista pequeña) con-formulado con, y/o co-administrado con, uno o mas agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o mas citocinas e inhibidores de factor de crecimiento, inmunosupresores,

agentes anti-inflamatorios, inhibidores metabólicos, inhibidores de enzimas, y/o agentes citotóxicos o citostáticos, como se describen aquí en mas detalle.

Ejemplos de agentes terapéuticos que pueden ser co-administrados y/o co-formulados con uno o mas agonista de IL-21/IL-21R para tratar esclerosis múltiple, incluye, pero no se limita a, uno o mas de: Interferón- β , por ejemplo, IFN β -1 α Y IFN β -1 β ; una proteína que simula la proteína básica de la mielina (por ejemplo, una proteína sintética, es decir, acetato de glatirámico, COPAXONE®); corticosteroides; IL-1 inhibidores; TNF inhibidores; anticuerpos a ligandos CD40 Y CD80; antagonistas de IL-12 y IL-23, por ejemplo, antagonistas de una subunidad p40 de IL-12 y IL-23 (por ejemplo, anticuerpos inhibitorios contra la subunidad p40); agonistas de IL-22; inhibidores de molécula pequeña, por ejemplo, metotrexato, leflunomida, sirolimus (rapamicina) y análogos de ellos, por ejemplo, CCI-779; inhibidores Cox-2 y Cpla2; NSAIDs; inhibidores p38; TPL-2; inhibidores M κ ; 2NF κ β ; RAGE o soluble RAGE; inhibidores de selectina o PSGL-1 (por ejemplo, inhibidores de moléculas pequeñas, anticuerpos de ellos, por ejemplo, anticuerpos para P-selectina; agonistas de estrógenos receptor beta (ERB) o antagonistas de ERB.NF κ β .

Ejemplos de inhibidores de TNF incluyen, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, efectivamente humanos, humano o generados in Vitro, o fragmentos que ligan al antígeno del mismo, que ligan al TNF; fragmentos solubles de un receptor de TNF, por ejemplo, p55 o p75 humano receptor de TNF o derivados del mismo, por ejemplo, 75 kdTNFR-IgG(75 Kd receptor de TNF-IgG proteína de fusión, ENBREL™), p55KD receptor TNF-proteína de fusión IgG, y enzimas antagonistas de TNF, por ejemplo, enzimas que convierten a inhibidores de TNF α (TACE).

Agentes terapéuticos adicionales que pueden ser co-administrados y /o co-formulados con uno o mas agonistas de IL-21/IL-21R incluyen uno o mas de: Interferón- β , por ejemplo, IFN β -1 α Y IFN β -1 β ; COPAXONE[®] corticosteroides; IL-1 inhibidores; TNF antagonistas (por ejemplo, un fragmento soluble de un receptor de TNF, por ejemplo, p55 o p75 humano receptor TNF o derivados del mismo, por ejemplo, 75 kdTNFR-IgG (receptor de 75 KDTNF-proteína de fusión IgG, ENBREL[™]); anticuerpos a ligandos CD40 Y CD80; antagonistas de IL-12 y IL-23, por ejemplo, antagonistas de una subunidad p40 de IL-12 y IL-23 (por ejemplo, anticuerpos inhibitorios contra la subunidad p40 de IL-12 y IL-23); metotrexato, leflunomida, sirolimus (rapamicina) y análogos de ellos, por ejemplo, CCI-779.

En otro aspecto, la invención caracteriza un método para modular, por ejemplo, incrementar o disminuir, la actividad celular inmune y/o el número (por ejemplo, la actividad y /o número de células inmunes, por ejemplo, un linfocito (por ejemplo una célula T) o una población de células inmunes, por ejemplo, una población de células inmunes mezcladas o sustancialmente purificadas. El método incluye poner en contacto una célula inmune, por ejemplo, una célula inmune como se describió aquí, con un agonista IL-21/IL-21R, por ejemplo, un agonista como se describió aquí, en una cantidad suficiente para modular, por ejemplo, incrementar o disminuir, actividad y/o número de células inmunes. En una modalidad, la actividad incluye la modulación, por ejemplo, incremento o disminución, de actividad o niveles de citosina. Por ejemplo, el agonista IL-21/IL-21R puede incrementar la producción o niveles linfocíticos de IL-10 y/o disminuir la producción o niveles del interferón- γ :

El método sujeto puede ser usado en células en cultivo, por ejemplo in vitro o ex vivo. Por ejemplo, células inmunes, es decir, células T como se describe aquí, pueden ser cultivadas in Vitro o en medios de cultivo y la tapa de poner en contacto puede efectuarse agregando uno o mas agonistas de IL-21/IL-21R, por ejemplo, un agonista como se describe aquí, para el medio de cultivo. Alternativamente, el método puede llevarse a cabo sobre células (por ejemplo, células inmunes como de describe aquí) presente en un sujeto, por ejemplo, como parte de un protocolo in vivo (por ejemplo, protocolo terapéutico o profiláctico)

Un cambio en la actividad celular inmune incluye algunas variaciones, por ejemplo, aumento/disminución, en uno o mas de: proliferación, secreción de citocinas y /o producción, supervivencia, diferenciación, respuesta celular (por ejemplo, desensitización), actividad de la citosina, actividad de la célula efector ,expresión del gene, entre otros, de la célula inmune puesto en contacto con una agonista IL-21/IL-21R, comparado con una referencia, por ejemplo, una célula inmune no tratada. Por ejemplo, poner en contacto una célula inmune con una molécula IL-21/IL-21R, por ejemplo, un polipéptido IL-21 puede inducir uno o mas de: proliferación, actividad citolítica, función efector celular, o secreción de citosina de una o mas de: timocitos, linfocitos, células T de nódulos linfáticos, células T CD4+maduras, célula T CD8+maduras o macrófagos. En una modalidad el agonista IL-21/IL-21R, puede incrementar la producción lfoncítica o niveles de IL-10 y/o disminuir la producción i niveles de interferón- γ .

En otro aspecto la invención caracteriza un método para modular una deficiencia de IL-10 o un desorden asociado con una deficiencia de IL-10 en un sujeto mamífero. El método incluye administrar al sujeto un polipéptido de interleucina-21(IL-21 en una cantidad suficiente para incrementar la expresión y IL-

10 o actividad en el sujeto, por ejemplo, en por lo menos incrementar 1,2, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 ,5 o 10 veces, por ejemplo, entre 1,2-2,5 veces de incremento o entre 2,5-5 veces incremento, 5 a 10 veces de incremento, o mayores de 10 o 20 veces de incremento. Una "deficiencia IL-10" es una disminución estadísticamente significativa en IL-10 en relación a un sujeto normal correspondiente. Por ejemplo, la disminución puede tener el valor P de menos de 0,05. Ya que IL-21 u otro agonistas de IL-21/IL-21R pueden ser usados para incrementar los niveles de IL-10 o su actividad, el IL-21 y cada agonista pueden ser usados para modular una deficiencia de IL-10.

Los niveles de IL-10 pueden ser monitoreados, por ejemplo, en la sangre, en el suero, o el fluido cerebroespinal. Desordenes ilustrativos que pueden ser asociados con una deficiencia del IL-10 incluyen la esclerosis múltiple, eventos inflamatorios significativos (incluyendo isquemia y daños de repercusión), soriasis y pemfigus. Ya que el IL-21 puede incrementar los niveles de IL-10, el IL-21 puede ser usado para tratar un síntoma de estos desordenes y otros asociados con una deficiencia de IL-10.

En otro aspecto, la invención caracteriza un método para mejorar la esclerosis múltiple en un sujeto mamífero, por ejemplo, un humano. El método incluye: administrar al sujeto un polipéptido interleucina -21(IL-21) en una cantidad suficiente para mejorar la esclerosis múltiple o por lo menos un síntoma de esclerosis múltiple en el sujeto. Por ejemplo, cuando el sujeto es humano, el polipéptido de IL-21 puede ser un polipéptido de IL-21 humano, por ejemplo, un polipéptido que incluye la ID de Sec. No. 2, o un polipéptido de IL-21 humano efectivamente. Por ejemplo, el polipéptido es producido recombinantemente, por ejemplo, en una célula bacterial. En una modalidad, el método incluye administrar ,

al sujeto un polipéptido de interleucina-21 (IL-21) en una cantidad suficiente para aumentar la expresión o actividad del IL-10 en un sujeto, por ejemplo, por lo menos un incremento de 1,2, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 5, o 10 veces, por ejemplo, entre incremento de 1,2-2,5 veces o entre incrementos de 2,5-5 veces, un incremento de 5-10 veces, o mayor a 10 o 20 veces el incremento. El método puede incluir otros factores descritos aquí.

En otro aspecto, la invención caracteriza un método para tratar o impedir un desorden inmunológico en un sujeto mamífero. El método incluye evaluar un parámetro IL-10 en un sujeto mamífero; y administrar al sujeto, un polipéptido de interleucina-21 (IL-21) en una cantidad que es dependiente de los resultados del parámetro del IL-10 evaluado. Por ejemplo, el parámetro IL-10 incluye información cualitativa y cuantitativa acerca de los niveles de la proteína IL-10 o del mRNA. En otro ejemplo, el parámetro de IL-10 incluye información cuantitativa acerca de los niveles de la actividad de la proteína IL-10.

En otra modalidad, el desorden inmunológico es un desorden neurológico. Por ejemplo, el sujeto es humano y el desorden inmunológico es esclerosis múltiple o un desorden inmunológico que causa daño o alteración a las cubiertas de mielina. El método puede incluir otros rasgos descritos aquí.

En otra, la invención caracteriza un método para evaluar el tratamiento de la esclerosis múltiple en un sujeto mamífero. El método incluye: administrar, al sujeto, un agonista o un receptor de interleucina-21 (IL-21)/IL-21 (IL-21R) (por ejemplo, un polipéptido de IL-21, un anticuerpo agonístico IL-21R y un fragmento que libera al antígeno de un anticuerpo agonístico anti IL-21R); y evaluar un parámetro de IL-10 en el sujeto. En una modalidad, el método incluye

adicionalmente administrar al sujeto una segunda dosis del agonista, en donde la segunda dosis es administrada como una función del parámetro evaluado de IL-10.

En una modalidad, el sujeto es humano, y el polipéptido IL-21 es un polipéptido de IL-21 humano, por ejemplo, un polipéptido que incluye la ID de Sec. No. 2.

En una modalidad, la segunda dosis o cualquier dosis subsiguiente es creada para suministrar un polipéptido de interleucina-21 (IL-21) en una cantidad suficiente para aumentar la expresión o actividad del IL-10 en el sujeto, por ejemplo, por lo menos 1,2, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 5, o 10 veces el incremento, por ejemplo, el incremento entre 1,2-2,5 veces o entre incremento de 2,5-5 veces, o incrementos de 5-10 veces, o mayor a 10 o 20 veces, por ejemplo, con relación a la línea base, por ejemplo, antes de un primer tratamiento. En un método relacionado la primera dosis fabricada así. El método puede incluir otros rasgos descritos aquí.

En otro aspecto, la invención suministra, composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, las cuales incluyen un vehículo farmacéuticamente aceptable y por lo menos un agonista de IL-21/IL-21R como se describe aquí (por ejemplo, un polipéptido o proteína de fusión de IL-21 descrito aquí). En una modalidad, las composiciones, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas comprenden una combinación de dos o mas de uno de los mencionados agonistas de IL-21/IL-21R). Combinaciones de los agonistas IL-21/IL-21R y una droga, por ejemplo, un agente terapéutico (por ejemplo, uno o mas citocinas o inhibidores de factores de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, inhibidores metabólicos, inhibidores de enzimas, y/o agentes citotóxicos o citoestáticos, como se describen aquí) están también dentro del alcance de la invención.

En una modalidad, la composición farmacéutica incluye un agonista de IL-21/IL21R y por lo menos un agente terapéutico adicional, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de agentes terapéuticos adicionales preferidos que pueden ser co-formulados en una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, con uno o mas agonistas de IL-21/IL-21R, incluyen, pero no se limitan a uno o mas de: Interferón β , por ejemplo, IFN β -1 α Y IFN β -1 β ; una proteína que simula la proteína básica de la mielina (por ejemplo, COPAXONE[®]); corticosteroides; IL-1 inhibidores; TNF antagonistas; (por ejemplo, un fragmento soluble de un receptor TNF, por ejemplo, p55 o p 75 humana de receptor TNF o derivados del mismo, por ejemplo, 75 kdTNFR-IgG (receptor 75Kd TNF-proteína de fusión IgG, ENBREL[™]); anticuerpos a ligandos CD40 Y CD80; y antagonistas de IL-12 y/o IL-23, por ejemplo, antagonistas de una subunidad p40 de IL-12 y IL-23 (por ejemplo, anticuerpos inhibitorios contra la subunidad p40); metotrexato, leflunomida, sirolimus (rapamicina) y análogos de ellos, por ejemplo, CCI-779.

En otro aspecto, la invención caracteriza un artículo de manufactura que incluye (i) un contenedor con una o mas dosis unitarias de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de IL-21; y (ii) instrucciones para administrar las dosis unitarias a un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene, esclerosis múltiple. Por ejemplo, las instrucciones son suministradas sobre una etiqueta. La etiqueta puede ser fijada a una superficie externa del contenedor. En una modalidad, el artículo incluye un segundo contenedor, por ejemplo, que contiene una dosis unitaria adicional de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido IL-21. En una modalidad, el artículo incluye adicionalmente un segundo contenedor una segunda composición farmacéutica que comprende un agente

para tratar esclerosis múltiple, es decir, un agente diferente a IL-21. Por ejemplo, el agente es un acetato glatirámico u otro agente descrito aquí. En otra modalidad, la composición farmacéutica que incluye un polipéptido de IL-21 en un contenedor, incluye adicionalmente un segundo agente para tratar la esclerosis múltiple, por ejemplo, acetato glatirámico.

Los términos "MU-1" y "IL-21R" son usados de manera intercambiable aquí. Los términos "péptidos", "polipéptidos", y "proteínas" son usados de manera intercambiable aquí. Una proteína puede incluir una o mas cadenas.

El significado estadístico puede ser determinado por cualquier método de la técnica conocido. Los ensayos estadísticos e ilustrativos incluyen: el ensayo de estudiantes T, el ensayo de no paramétrico de Mann Whitney U, y el ensayo estadístico no paramétrico de Wilcoxon. Algunas relaciones significantes estadísticamente tiene un valor P menor que 0,05 o 0,02. Efectos particulares mediados por un agonista IL-21/IL21R pueden mostrar una diferencia que es significativa estadísticamente (por ejemplo, valor P menor que 0,05 o 0,02). Los términos "induce", "inhibe", "potencia", "eleva", "incrementa", "disminuye" o similares, por ejemplo, que denotan diferencias distinguibles cualitativa o cuantitativas entre dos estados, y pueden referirse a una diferencia, por ejemplo, a una diferencia estadísticamente significativa, entre dos estados.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por cualquier versado en la materia a la cual la invención pertenece. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí pueden ser usados en la práctica o en los ensayos de la invención, los métodos adecuados y

los materiales son descritos mas abajo. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes, y otras referencias mencionadas aquí se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente especificación, incluye definiciones, controles adicionalmente, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solamente y no tienen el propósito de limitar.

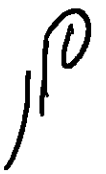
Otros rasgos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1A es un gráfico lineal que ilustra la proliferación incrementada de las células del nodo linfático, cultivadas en al presencia de 20 ng/ml de IL-21 de murina en diversas diluciones. Por ejemplo, a una dilución de 1:50 la IL-21 causó el incremento en la proliferación de células del nodo linfático en comparación con las células estimuladas con péptidos solamente.

La figura 1B es un gráfico lineal que ilustra el incremento de la proliferación de células T de la proteína proteolípida (PLP) de ratones transgénicos cultivados en las concentraciones indicadas de IL-21 de murina (ng/ml) y 1 µg/ml de PLP en comparación con células tratadas con solamente un µg/ml de PLP. El gráfico muestra que el IL-21 induce la proliferación de células T desde las ratones transgénicos PLP.

La figura 2 es un gráfico de barras que ilustra la secreción incrementada de IL-10 en la presencia de concentraciones indicadas de IL-21 de ratón en comparación con células no tratadas. La respuesta más saturable y la concentración de ensayo



más alta de IL-21 (25 ng/ml), de células produjo aproximadamente 2,5 veces más de IL-10 que en el grupo de control. La producción de niveles incrementados de IL-10 sugiere que el tratamiento con IL-21 puede dirigir las células específicas de antígeno hacia un perfil Th2.

La figura 3 es un gráfico de barras que muestra una disminución en la secreción de IFN γ por células del vaso y del nodo linfático tratadas con las concentraciones indicadas de IL-21 de murina comparadas con las células de control. En adición del IL-21 a las células de vaso estimuladas MOG 33-55 de ratones inmunizados resulta en una disminución dos veces del IFN γ , mientras que la adición de IL-21R causa un incremento de dos veces.

La figura 4 ilustra una reducción en síntomas clínicos de enfermedad en un modelo EAE. La figura muestra que el IL-21 suprime el IFN γ y promueve el IL-10. La figura 4 es un gráfico lineal que muestra la disminución de los síntomas EAE detectados en células de vaso PLP tratadas con IL-21 en comparación con cultivos no tratados con respecto a los días post transferencia in vivo.

La figura 5 ilustra una reducción en los síntomas clínicos de la enfermedad en un modelo EAE. Este es un gráfico de barras que ilustra una disminución en la severidad del EAE en ratones tratados sea con dosis baja (100ng/día) o alta (1 μ g/día de IL-21 de murina comparada con los ratones de control.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los métodos y composiciones para modular la actividad de la interleucina-21 (IL-21)/ receptor de la IL-21 (MU-1) usando agonistas de IL-21 o receptor de IL-21

111

("IL-21R" o "MU-1"), se describe. En una modalidad, los solicitantes han mostrado que el tratamiento de ratones con un agonista de IL-21/ IL-21R, por ejemplo, polipéptido IL-21 de murina resulta en mejoramiento de los síntomas en los modelos de ratón para en la encefalomiелitis auto inmune experimental (EAE). La modulación de los síntomas de EAE fue detectada en modelos de ratón generados usando péptido de glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) (por ejemplo, MOG 35-55) y proteína proteolípida (PLP). El IL-21 indujo la proliferación de células T in vitro. Los linfocitos cultivados en la presencia de IL-21 produjeron cantidades incrementales de IL-10 y niveles disminuidos de interferon- γ . De acuerdo a lo anterior, los agonistas de actividad IL-21/ IL-21R puede ser usados para tratar o prevenir desordenes inmunológicos del sistema nervioso (por ejemplo, desordenes inmunológicos crónicos del sistema nervioso, incluyendo la esclerosis múltiple).

Para poder hacer que la presente invención sea más fácilmente entendida, ciertos términos se definen primero. Las definiciones adicionales se establecen a través de la descripción detallada.

Los términos "interleucina-21", "IL-21" y "polipéptido IL-21" se refiere a una proteína (por ejemplo, de un mamífero, por ejemplo, murina o proteína humana) que es capaz de interactuar con por ejemplo, ligarse a, el IL-21R (por ejemplo, de un mamífero, por ejemplo, murina o proteína humana) y que tiene uno de los siguientes rasgos: (i) una secuencia de aminoácidos de una ocurrencia natural del IL-21 en mamíferos o fragmentos del mismo, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos mostrada como ID de Sec. No.: 2 (humano) o ID de Sec. No.:4 (murina) o un fragmento del mismo; (ii) una secuencia de aminoácido substancialmente homóloga a, por ejemplo, por lo menos en un 85%, 90%, 95%,

112

98%, 99% homóloga a, una secuencia de aminoácido mostrada como ID de Sec. No.:2(humana) o ID de Sec. No.:4 (murina) o un fragmento del mismo; (iii) una secuencia de aminoácidos que está codificada por la secuencia de nucleótido de IL-21 de mamífero de ocurrencia natural o fragmentos del mismo, (por ejemplo, la ID de Sec. No.:1 (humana) o ID de Sec. No.:3(murina) o un fragmento del mismo, por ejemplo, una región que codifica en una forma madura); (iv) una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótido que es sustancialmente homóloga a, por ejemplo, por lo menos en un 85%, 90%,95%, 98%, 99% homóloga a, una secuencia de nucleótido mostrada como ID de Sec. No.:1(humana) o ID de Sec. No.:3 (murina), o un fragmento de los mismos (por ejemplo, una región que codifica a una forma madura); (v) una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótido degenera en una secuencia de nucleótido IL-21 de ocurrencia natural o un fragmento del mismo, (por ejemplo, la ID de Sec. No.:1 (humana) o ID de Sec. No.:3 (murina), o un fragmento del mismo (por ejemplo, una región que codifica una forma madura); o (vi) una secuencia de aminoácido, de por lo menos 115 aminoácidos que está codificada por secuencia de nucleótidos que hibridiza al complemento de uno de las anteriores secuencias de nucleótidos bajo condiciones astringentes, ejemplo, condiciones altamente astringentes (por ejemplo, la secuencia de nucleótido hibridiza en una región que codifica una proteína IL-21 madura. El IL-21 se liga al IL-21R y puede llevar a señalizar stat5 o stat3 (Ozaki et al. (2000) supra). El polipéptido IL-21 puede ser procesado de una proteína naciente que incluye una secuencia de señal en una proteína madura, de la cual la secuencia de señal ha sido removida.

Un polipéptido IL-21 "efectivamente humano" es un polipéptido IL-21 que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos humanos tal que el polipéptido

no se divide en una respuesta inmunogénica en un humano normal y por lo tanto el polipéptido IL-21 interactúa con un IL-21R humano.

Los términos "MU-1", "proteína MU-1" "receptor de interleucina-21" o "IL-21R" se refiere a una receptor (por ejemplo, de mamífero, por ejemplo, murina o origen humano) que es capaz de interactuar con por ejemplo, ligarse a, el IL-21 (por ejemplo, de un mamífero, por ejemplo, murina o IL-21 humano) y tener uno de los siguientes rasgos: (i) una secuencia de aminoácidos de un polipéptido MU-1 IL-21R/MU-1 de mamífero de ocurrencia natural o un fragmento de el, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos mostrada como ID de Sec. No.:6 (humana) o ID de Sec. No.:8 (murina) o un fragmento de los mismos (por ejemplo, en la región madura); (ii) una secuencia de aminoácido substancialmente homóloga a, por ejemplo, por lo menos 85%, 90%, 95%, 98%, 99% homóloga a, una secuencia de aminoácido mostrada como ID de Sec. No.:6(humana) o ID de Sec. No.:8 (murina) o un fragmento del mismo (por ejemplo, en la región madura); (iii) una secuencia de aminoácidos que está codificada por una secuencia de nucleótido IL-21R/MU-1 de ocurrencia natural en mamíferos (por ejemplo, la ID de Sec. No.:5 (humana) o ID de Sec. No.:7 (murina)) o un fragmento del mismo (por ejemplo, en la región madura); (iv) una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótido que es substancialmente homólogo a, por ejemplo, por lo menos 85%, 90%, 95%, 98%, 99% homólogo a, una secuencia de nucleótido mostrada como ID de Sec. No.:5(humana) o ID de Sec. No.:7 (murina) o un fragmento de ellos (por ejemplo, la región madura); (v) una secuencia de aminoácido codificada por una secuencia de nucleótido que degenera en una secuencia de nucleótido IL-21R/MU-1 de ocurrencia natural o un fragmento del mismo, (por ejemplo, la ID de Sec. No.:5 (humana) o ID de Sec. No.:7(murina), o un fragmento del mismo (por ejemplo, la región madura); o (vi) una secuencia de aminoácido, de por lo menos

450 aminoácidos que es codificada por secuencia de nucleótido que hibridiza a un de las secuencias de nucleótidos anteriores bajo condiciones astringentes. La región madura del IL-21 humano listada en la ID de Sec. No.: 6 es desde cerca de 20 a 538 aminoácidos.

Un cADN de IL-21R/MU-1 ilustrativo fue depositado con el American Type Culture Collection on Mar. 10, 1998, con número de acceso ATCC 98687.

El IL-21R es un receptor de las familias de las citosinas clase I, también conocido como NILR (WO 01/85792; Parrish-Novak *et al.* (2000) *Nature* 408:57-63; Ozaki *et al.* (2000) *Proc Natl.Acad.Sci. USA* 97:11439-11444). El IL-21R es homólogo a la cadena β compartida de los receptores IL-2 e IL-15, y la cadena α del receptor IL-4 (Ozaki *et al.* (2000) *supra*). Luego de ligar el ligando, el IL-21R/MU-1 es capaz de interactuar con una cadena de receptor de citosina γ (γc) (Asao *et al.* (2001) *J.Immunol.* 167:1-5), e inducir la fosforilación del STAT1 y STAT3 (Asao *et al.* (2001) o STAT5 (Ozaki *et al.* (2000))). El IL-21R muestra una distribución amplia del tejido linfoide.

Las formas de las proteínas IL-21 de menos de longitud completa que pueden ser listadas en los métodos y composiciones, descritos aquí, siempre que este retenga la habilidad de ligarse a un polipéptido de IL-21R. Las proteínas de IL-21 de menos de la longitud completa que puedan ser producidas por medio de expresar un fragmento correspondiente del polinucleótido que codifica la proteína de IL-21 de longitud completa en una célula anfitriona, o por medio de expresar un polinucleótido que codifica una proteína modificada (por ejemplo, si uno o mas aminoácidos internos son removidos). Una forma de polipéptido IL-21 que es menor que la longitud completa es el IL-21 maduro, por ejemplo, un IL-21 de

705
115

secuencia ID de Sec. No.: 2. Otra forma es un polipéptido que es mas corto que la longitud completa, el IL-21 maduro, por ejemplo, menos de 131, 130, 129, 128, o 125 aminoácidos, por ejemplo, entre 115 y 130 aminoácidos en longitud. Por ejemplo, un polipéptido IL-21 derivado de la ID de Sec. No.:2 puede faltarle os ocho aminoácidos finales o un subconjunto de ellos, por ejemplo, el polipéptido IL-21 comprende los aminoácidos 1 a 122. los fragmentos de polinucleótido correspondiente también pueden ser usados en los métodos y composiciones de la presente invención los polinucleótidos modificados como se describió anteriormente pueden ser hechos por técnicas de biología moléculas estándar, incluyendo construcciones de mutantes de eliminación deseados, métodos de mutagénesis dirigidas a sitios o por la reacción de la cadena de polimerasa usando los iniciadores de oligonucleótidos apropiados.

La frase "una actividad biológica" un polipéptido MU-1 o IL-21R se refiere a una o mas de las actividades biológicas de la proteína MU-1 madura correspondiente incluyendo, pero sin limitarse a (1) interactuar con, por ejemplo, ligarse a un polipéptido IL-21 (por ejemplo, un polipéptido IL-21 humano); (2) asociarse con moléculas de transducción de señal por ejemplo, γc , jak1; (3) la fosforilación estimulante y/o la activación de las proteínas stat, por ejemplo, STAT5 y/o STAT3; y/o (4) modular, por ejemplo, estimular o disminuir la proliferación, diferenciación, función de célula efectora, actividad citolítica, secreción citosina, y/o supervivencia de las células inmunes, por ejemplo, las células T (CD8+, células T CD4+), células NK, células B, macrófagos y megacariocitos).

Como se usa aquí un "agonista de IL-21/IL-21R" se refiere a un agente que potencia, induce o de otra manera promueve una o más actividades biológicas de un polipéptido IL-21R/MU-1, por ejemplo, una actividad biológica como se describe

aquí. Por ejemplo, el agonista interactúa con, por ejemplo, se liga a un polipéptido IL-21R/MU-1. en una modalidad, un agonista interactúa con el IL-21R y otra cadena receptora, por ejemplo, la cadena receptora de citosina γ . Por ejemplo, el agonista retícula el IL-21R y la cadena receptora de citosina γ .

Como se usa aquí, una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un agonista IL-21/ IL-21R se refiere a una cantidad de un agente que es efectivo, luego de administración de dosis única o múltiple a un sujeto, por ejemplo, un paciente humano, de curar, reducir la severidad de, mejorar en uno o mas de los síntomas de un desorden, por ejemplo, un desorden como el descrito aquí, o en prolongar la supervivencia del sujeto mas allá de lo esperado en ausencia de tal tratamiento.

Como se usa aquí, una "cantidad profilácticamente efectiva" de un agonista IL-21/ IL-21R se refiere a una cantidad de un agonista IL-21/ IL-21R que es efectiva, luego de administración de una dosis única o múltiple a un sujeto, por ejemplo, un paciente humano, en prevenir o retardar la ocurrencia de un desorden, por ejemplo, un desorden como el descrito aquí.

Los términos "induce", "inhibe", "potencia", "eleva", "incrementa", "disminuye" o similares, por ejemplo, en los cuales denotan diferencias cuantitativas entre dos estados, se refieren a por lo menos diferencias estadísticamente significativas entre los dos estados.

El término "en combinación" en este contexto significa que los agentes están dados substancialmente contemporáneamente, sea simultáneamente o secuencialmente. Si se dan secuencialmente, el establecimiento de la administración del segundo compuesto, el primero de los dos compuestos es

preferiblemente detectable todavía en concentraciones efectivas en el sitio de tratamiento.

Como se usa aquí, una "proteína de función" se refiere a una proteína que contiene dos o mas partes ligadas asociadas operablemente, por ejemplo, partes de proteína. Preferiblemente, las partes están asociadas covalentemente. Las partes pueden estar asociadas directamente, o conectadas por medio de un espaciador o un enlazador.

Secuencias similares u homólogas (por ejemplo, por lo menos el 85% de identidad en la secuencia) a las secuencias descritas aquí son también parte de esta solicitud. En alguna modalidad la identidad de la secuencia puede ser de cerca de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor. Alternativamente, la identidad sustancial existe cuando los segmentos de ácido nucleico hibridizan bajo condiciones de hibridización selectiva (por ejemplo, condiciones de hibridización altamente astringentes), al complemento de la secuencia. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en las células completas, en un lisato de célula, o en una forma parcialmente purificada o substancialmente pura.

Los cálculos de "homología" o "identidad de secuencia" entre dos secuencias (los términos son usados intercambiabilmente aquí) se lleva a cabo como sigue. Las secuencias son alineadas para un propósito de comparación óptima (por ejemplo, los espacios pueden ser introducidos en uno o ambos de le primero y segundo aminoácidos o secuencia de ácidos nucleicos para la alineación óptima y secuencias no homólogas pueden ser descartadas con propósitos comparativos). En una modalidad preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada

con propósitos de comparación es de por lo menos 30%, preferiblemente por lo menos 40%, más preferiblemente por lo menos 50% y aún más preferiblemente por lo menos 60%, y aún más preferiblemente por lo menos 70%, 80%, 90%, 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Los residuos del aminoácido o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos correspondientes o posiciones de nucleótidos son entonces comparadas. Cuando una posición en la primera secuencia es ocupada por el mismo residuo o nucleótido de aminoácido que en la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa aquí "identidad" de aminoácido o de ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, tomando en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, lo que requiere ser introducido por un alineamiento óptimo de las dos secuencias.

La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede llevarse a cabo utilizando un algoritmo matemático. La comparación usa el programa GAP del paquete de software GCG (www.gcg.com) y los parámetros que incluye una matriz Blossum 62 marcaciones con una pena de espacio de 12, una pena de extensión de espacio de 4, y una pena de cambio de espacio de 5.

Como se usa aquí, el término "hibridiza bajo condiciones astringentes" describe condiciones para la hibridización y lavado. Las condiciones astringentes son conocidas por aquellos versados en la técnica y pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3, 1-6.3.6. los métodos acuosos y no acuosos son descritos en esa referencia y cualquiera

puede ser usado. Un ejemplo de condiciones de hibridización astringentes es la hibridización en cloruro de sodio/ citrato de sodio 6X (SSC) en cerca de 45°C, seguido por uno o más lavados en SSC X 0,2, 0,1% de SDS a 50 °C. Otro ejemplo de condiciones de hibridización astringente es la hibridización en SSC 6X en cerca de 45°C, seguido por uno o más lavados en 0,2 X SSC, 0,1% SDS a 55 °C. Un ejemplo adicional de condiciones de hibridización astringente es la hibridización en 6X SSC a cerca de 45°C, seguido por uno o más lavados en 0,2 X SSC, 0,1% SDS a 60 °C. Preferiblemente, las condiciones de hibridización astringente son la hibridización en 6X SSC a cerca de 45°C, seguido por uno o más lavados en 0,2 X SSC, 0,1% SDS a 65 °C. Particularmente preferidas las condiciones altamente astringentes (y las condiciones que deberían ser usadas si el practicante está dudando de cuales sean las condiciones que deben aplicarse para determinar si una molécula está dentro de la limitación de hibridación) son fosfato de sodio al 0,5M, 7% de SDS a 65 °C, seguido por uno o más lavados con 0,2 X SSC, 0,1% SDS a 65 °C.

Los agonistas IL-21/IL-21R pueden tener sustituciones de aminoácido conservativas o no esenciales, que no tiene un efecto sustancial en sus funciones. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la cual el residuo de aminoácido es remplazado con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuo de aminoácido que tiene cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina); cadenas acídicas laterales (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales no cargadas polares (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteina), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofan), cadenas

120/110

laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofan, histidina).

Agonista IL-21/IL-21R

Los agonistas IL-21/IL-21R usados en los métodos y composiciones pueden ser un polipéptido IL-21, por ejemplo, un polipéptido IL-21 humano o de murina, o un fragmento activo de ellos (por ejemplo, un polipéptido IL-21 humano que comprende la secuencia de aminoácido mostrada como ID de Sec. No.2 o una secuencia de aminoácido que incluye una reacción que codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada como ID de Sec. No.: 1, o una secuencia de por lo menos de 85%, 90%, 95%, 98% o más de idéntica a ella) (por ejemplo, la región de la ID de Sec. No.: 1 que codifica un polipéptido IL-21 maduro. En otra modalidad, el agonista IL-21/IL-21R es un polipéptido IL-21 de murina o un fragmento activo de ellos (por ejemplo, un polipéptido IL-21 de murina que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como ID de Sec. No.: 4, o codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada como ID de Sec. No.: 3, o una secuencia por lo menos 85 %, 90%, 95%, 98% o más de idéntica a ella), o un polipéptido IL-21 de otro manigero, por ejemplo un primate no humano, un bovino, etc.

La secuencia de aminoácidos de polipéptidos IL-21 son conocidos públicamente. Por ejemplo, la secuencia de nucleótido y la secuencia de aminoácidos de un IL-21 humano está disponible en GENBANK® No. de Acceso X_011082. Una secuencia de nucleótido IL-21 humana ilustrativamente se presenta abajo:

121

1 gctgaagtga aaacgagacc aaggtctagc tctactgttg gtacttatga gatccagtc
61 tggcaacatg gagaggattg tcatctgtct gatggcatc ttctgggga cactggicca
121 caaatcaagc tccaaggtc aagatcgcca catgattaga atgcgtcaac ttatagatat
181 tgttgatcag ctgaaaaatt atgtgaatga ctgggtccct gaatttctgc cagctccaga
241 agatgtagag acaaactgtg agtggtcagc ttttctctgc tticagaagg cccaactaaa
301 gtcagcaaata acaggaaaca atgaaaggat aatcaatgta tcaattaaaa agctgaagag
361 gaaaccacct tcacaaatg cagggagaag acagaaacac agactaacat gcccttcag
421 tgattcttat gagaaaaaac caccxaaaga attcctagaa agattcaaat cacttctcca
481 aaagatgatt catcagcatc tgcctctag aacacacgga agtgaagatt cctgaggatc
541 taacttcag ttggacacta tgttacatac tctaatatag tagtgaaagt catttcttg
601 tattccaagt ggaggag (ID de Sec. No.: 1)

La información de secuencia de nucleótidos adicional está disponible, por ejemplo de AF254069 [gi:11093535] la cual suministra una secuencia de mRNA 642 bp que codifica un polipéptido IL-21 ilustrativo. En algunas modalidades, es suficiente usar la región de la secuencia del nucleótido que codifica el IL-21 maduro, por ejemplo, sin una región que codifique una secuencia de señal. La secuencia de aminoácido de un polipéptido IL-21 humano maduro ilustrativo es presentada enseguida.

QDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDLVPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKS
ANTGNNERIINVSIIKLLKRKPPSTNAGRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKS
LLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (ID de Sec. No.: 2)

La secuencia madura es basada en Parrish-Novak *et al.* (2000) *Nature* 408:57-63.

La secuencia de longitud completa es:

122

MRSSPGNMERIVICLMVIFLGTLVHKSSSQGQDRHMIRMRLIDIVDQLKNYVNDL
VPEFLPAPEDVETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERIINVSIIKKLKRKPPSTNA
GRRQKHRLTCPSCDSYEKKPPKEFLERFKSLLQKMIHQHLSSRTHGSEDS (ID de
Sec. No.: 10)

Entradas adicionales suministran la secuencia de aminoácidos para polipéptidos
IL-21 humanos son como sigue:

gi|11141875|ref|NP_068575.1| interleucina 21 [*Homo sapiens*];
gi|11093536|gb|AAG29348.1| interleucina 21 [*Homo sapiens*];
gi|42542586|gb|AAH66259.1| interleucina 21 [*Homo sapiens*];
gi|42542588|gb|AAH66260.1| interleucina 21 [*Homo sapiens*];
gi|42542657|gb|AAH66261.1| interleucina 21 [*Homo sapiens*];
gi|42542559|gb|AAH66258.1| interleucina 21 [*Homo sapiens*]; y
gi|42542807|gb|AAH66262.1| interleucina 21 [*Homo sapiens*]. El polipéptido IL-21
humano puede ser una variante de un polipéptido descrito aquí, siempre que este
retenga su funcionalidad.

Los polipéptidos IL-21 pueden ser codificado por ácidos nucleicos que hibridizan
en la secuencia nucleótido establecida en la ID de Sec. No.: 1, ID de Sec. No.: 3,
ID de Sec. No.: 5 o ID de Sec. No.: 7 o el complemento de ellos, bajo una
condición descrita aquí, por ejemplo condiciones altamente astringentes (por
ejemplo, 0,1X SSC a 65° C). Polinucleótidos aislados que codifican las proteínas
IL-21 /IL-21R o proteínas de fusión, pero que difieren de la secuencia de
nucleótido establecido en la ID de Sec. No.: 1, ID de Sec. No.: 3, ID de Sec. No.: 5
o ID de Sec. No.: 7, por virtud de la degeneración del código genético puede ser
usado. Las variaciones en la secuencia de nucleótido como se establece en la ID

de Sec. No.: 1, ID de Sec. No.: 3, ID de Sec. No.: 5 o ID de Sec. No.: 7, que son causadas por mutaciones puntuales o por modificaciones inducidas también pueden ser usadas.

En todavía otras modalidades, el agonista IL-21/IL-21R es una proteína de fusión que comprende un polipéptido de IL-21, por ejemplo un polipéptido de IL-21 de humano de murina, o un fragmento del mismo y, por ejemplo, fusionado a, una segunda parte, por ejemplo, un polipéptido (por ejemplo, un GST, Lex-A, secuencia de polipéptido MBP o una cadena de inmunoglobulina, incluyendo, por ejemplo, un fragmento Fc, unas regiones constantes de cadena pesada de diversos isotipos, incluyendo: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, y IgE).

Las proteínas de fusión pueden adicionalmente incluir una secuencia enlazadora que une el fragmento IL-21 o IL-21R a la segunda parte. Por ejemplo, proteína de fusión puede incluir un enlazador de péptido, por ejemplo un enlazador de péptido, por ejemplo de cerca de 4 a 20, más preferiblemente, de 5 a 10, aminoácidos en longitud; el enlazador de péptido es de 8 aminoácidos en longitud. Cada uno de los aminoácidos en el enlazador de péptido es seccionado del grupo que consiste de Gly, Ser, Asn, Thr y Ala; el enlazador de péptido incluye un elemento Gly-Ser. En otras modalidades, la proteína de fusión incluye un enlazador de péptido y el enlazador de péptido incluye una secuencia que tiene la Fórmula (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly, ID de Sec. No.: 11) y en donde y es por ejemplo, 1,2, 3,4, 5, 6, 7, o 8.

En otras modalidades, las secuencias de aminoácido adicionales pueden ser agregadas en N o C-terminos de la proteína de extensión para facilitar la expresión, detección y/o aislamiento o purificación. Por ejemplo, la proteína de fusión, de IL-21 puede estar ligada a uno o más partes adicionales, por ejemplo,

GST, His6 de etiqueta, etiqueta FLAG. Por ejemplo, la proteína de fusión puede adicionalmente estar ligada a una proteína de fusión GST en la cual la secuencia de la proteína de fusión son fundidas en el C-terminos de GST (Es decir, glutaniona S-transferasa) como secuencias. Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de la proteína de fusión.

En otra modalidad la proteína de fusión incluye una secuencia de señal heteróloga (es decir, una secuencia de polipéptido que no está presente en un polipéptido que es codificado por ácido nucleico de IL-21) en su N-terminos. Por ejemplo, la secuencia nativa de señal que puede ser removida y remplazada con una secuencia de señal de una proteína. En ciertas células anfitrionas (por ejemplo, células anfitrionas de mamíferos), la expresión y/o secreción del agonista IL-21/IL-21R puede ser incrementada por el medio del uso de una secuencia de señal heteróloga. Las proteínas de IL-21R y los fragmentos de ella pueden ser producidos usan métodos similares, por ejemplo, para suministrar un inmunogen para obtener anticuerpos agonizantes que interactúan con el IL-21R.

Una proteína quimérica o de fusión puede ser producida por técnicas de ADN recombinantes estándar. Por ejemplo, fragmentos de ADN que codifican para diferentes secuencias de polipéptidos son ligados juntos en cuadro de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, empleando un terminal de extremo como o d extremo en Zig zag para la ligación, la digestión de la enzima de restricción para suministrar el terminal apropiado, llenando de extremos cohesivos según es apropiado, tratamiento de fosfatasa alcalina para evitar unión indeseable, y ligado enzimático. En otra modalidad, el gen de fusión puede ser sintetizado por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación PCR de los fragmentos de gen

125/15

puede llevarse a cabo usando iniciadores anclados que dan lugar colgados complementarios entre dos fragmentos de gen consecutivos que pueden subsecuentemente ser templados y reamplificados para generar una secuencia de gen quimérica (ver, por ejemplo, Ausubel *et al.* (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Más aún, muchos vectores de expresión están distribuidos comercialmente los cuales codifican una parte fusión (por ejemplo, una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina). Un agonista IL-21/IL-21R que codifica el ácidonucleico puede ser clonado en tal vector de expresión de modo que la parte de fusión es ligada en cuadro a la proteína de inmunoglobulina.

En algunas modalidades, los polipéptidos de fusión pueden existir como oligómeros, tales como dímeros (ejemplo, homo-o hetero-dímeros) o trímeros. El prior polipéptido y/o ácidosnucleicos que codifican el primer polipéptido pueden ser contruidos usando métodos conocidos en la técnica.

En algunas modalidades, el primer polipéptido incluye un polipéptido agonista de IL-21/IL-21R de longitud completa (por ejemplo, de IL-21 mil). Alternativamente, el primer polipéptido comprende polipéptido IL-21/IL-21R con menos de su longitud completa. Un péptido de señal que puede estar incluido en la proteína de fusión es MPLLLLLLLLLPSPLHP (ID de Sec. No.: 9). Si es deseado, uno o más aminoácidos pueden adicionalmente ser insertados entre la primera parte del polipéptido que comprende la parte agonista de IL-21/IL-21R y la segunda parte de polipéptido.

El segundo polipéptido es preferiblemente soluble. En algunas modalidades, el segundo polipéptido mejora la vida media, (por ejemplo, la vida media del suero) del polipéptido ligado. En algunas modalidades el segundo polipéptido incluye una

secuencia que facilita la asociación del polipéptido de fusión con un segundo polipéptido agonista de IL-21/IL-21R. En modalidades preferidas, el segundo polipéptido incluye por lo menos una región de un polipéptido de inmunoglobulina. El polipéptido de fusión de inmunoglobulina es conocido en la técnica y se describe por ejemplo la Patente Estadounidense No. 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. El segundo polipéptido comprende un polipéptido con inmunoglobulina con menor longitud completa, por ejemplo una cadena pesada, cadena liviana, Fab, Fab2, Fv, o Fc. El segundo polipéptido puede incluir la cadena pesada de un polipéptido de inmunoglobulina. El segundo polipéptido puede incluir la región Fc de un polipéptido de inmunoglobulina.

En algunas modalidades, el segundo polipéptido tiene menor fusión efectora que en la fusión efectora de una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina tipo silvestre. La fusión efector de Fc incluye por ejemplo, el ligado de receptor Fc, en la fijación complementaria y la actividad vaciadora de célula T (ver por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 6,136, 310). Los métodos para ensayar la actividad vaciadora de la célula T, función efectora de de Fc, y la estabilidad de del anticuerpo son conocidas en la técnica. En una modalidad el segundo polipéptido tiene poca o ninguna afinidad por el receptor Fc. En una modalidad alternativa, el segundo polipéptido tiene poca o ninguna afinidad para la proteína complementaria C1q.

Los polinucleótidos de agonista de IL-21/IL-21R aislados descritos aquí pueden ser enlazados operativamente a una secuencia de control de expresión tal como

127

los vectores de expresión pMT2 o pED descritos en Kaufman et al., Ácidos Nucleicos Res. 19,4485-4490 (1991), para poder producir la proteína recombinantemente, muchas secuencias de control de expresión adecuadas son conocidas en la técnica. Métodos generales de expresar proteínas recombinantes también son conocidos y son ejemplificados en R. Kaufman, Methods in Enzymology 185,537-566 (1990). Como se definió aquí "enlazados operativamente" significa ligados enzimático o químicamente para formar un enlace covalente entre un polinucleótido particular que codifica una proteína de interés y la secuencia control de expresión, de tal manera que la proteína de interés (por ejemplo IL-21 otro agonista IL-21/IL-21R) es expresado por una célula anfitriona que ha sido transformada (Trasnfectada) con el polinucleótido ligado/secuencia de control de expresión.

El termino "Vector", como se ha usado aquí, tiene el propósito de referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar, o sostener en mantenimiento o replicación de, otro ácido nucleico al cual ella ha sido ligada. Un tipo de vector es un "plásmido", el cual se refiere a un lazo de ADN ramificado doble circular en el cual los segmentos de ADN adicional pueden ser ligados. Otro tipo de vector es un vector viral en donde segmentos de ADN adicionales pueden ser ligados dentro del genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula anfitriona por dentro de la cual ellos son introducidos (por ejemplo, vectores bacteriales que tienen un origen bacterial de replicación y vectores episómales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómales de mamíferos) pueden ser integrados dentro del genoma de una célula anfitriona luego de la introducción dentro de la célula anfitriona, y así son replicados junto con el genoma anfitrión. Más aún ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales ellos están ligados operativamente. Tales vectores son

referidos aquí como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinantes están frecuentes en la forma de plásmido. En la especificación presente, "plásmido" y "vector" pueden ser usados intercambiabilmente a medida ya que los plásmidos es la forma más comúnmente usada de vector. Sin embargo, la invención tiene el propósito de incluir tales otras formas de vectores de expresión, como vectores virales (por ejemplo retrovirus defectivos de replicación, adenovirus y virus asociados con ADN), que sirven funciones equivalentes.

El término "secuencia regulatoria" tiene el propósito de incluir promotores, mejoradores u otros elementos de control de expresión (por ejemplo señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpos. Tales secuencias regulatorias son descritas, por ejemplo, Goeddel; Gene Expression Technology : Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Podrá apreciarse por aquellos versados en la técnica que el diseño del vector de expresión, incluye la selección de secuencias regulatorias que deben depender de tales factores como la escogencia de la célula anfitriona que va hacer transformada, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. La secuencia regulatorias preferidas para la expresión de células anfitrionas de mamíferos incluyen elemento virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamíferos, tales como promotores y/o mejoradores derivados de el promotor FF-1 y BGH poli A, citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/mejorador CMV), el virus Simian 40 (SV40) (tal como promotor/mejorador SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío mayor de adenovirus (AdMLP)) y polioma. Para una descripción adicional de los elementos regulatorios virales, y la secuencia de los mismo, ver por ejemplo, la Patente

Estadounidense No. 5,168, 062 por Stinski, la Patente Estadounidense No. 4,510, 245 por Bell et al. y la Patente Estadounidense No. 4,968, 615 por Schaffner et al.

Los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales, tales como las secuencias que regulan la replicación del vector en las células anfitrionas (por ejemplo, orígenes de replicación) y los genes marcadores seleccionados. Los genes marcadores seleccionables facilitan la selección de la células anfitrionas en las cuales el vector ha sido introducido (ver por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 4,399, 216,4, 634,665 y 5,179, 017, todas por Axel et al.). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a las drogas, tal como la G418, higromicina o metotrexato, en una célula anfitriona dentro de la cual el vector ha sido introducido. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células anfitrionas dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para la selección G418).

Un número de células puede actuar como células anfitriona adecuadas para la expresión de la proteína agonista de IL-21/IL-21R o la proteína de función de la misma. Cualquier tipo célula capaz de expresar la proteína IL-21/IL-21R funcional puede ser usada. Las células anfitrionas de mamíferos adecuadas incluyen, por ejemplo, la célula COS de mico, las células de ovarios de Hámster chino (CHO), las células de riñón humano 293, las células epidérmicas humanas A431, las células humanas Colo205, las células 3T3, las células CV-1, otras líneas de células de primates transformadas, células diploides normales, sepas de células derivadas de cultivos in vitro de tejido primario, explantes primarios, células HeLa, células L de ratón, BHK, HL-60, U937, HaK, Rat2, BaF3,32D, FDGP-1, PC12, Mix o C2C12.

130 122

La proteína agonista IL-21/IL-21R o proteína de fusión de la misma puede también ser producida por enlazado operativo de un polinucleótido que codifica tal proteína para las secuencias de control adecuadas en uno o más vectores de expresión de insectos, y emplear un sistema de expresión de insectos. Los materiales y métodos para la expresión del baculovirus/célula de insecto en sistemas son comercialmente disponibles en forma de kit de, por ejemplo Invitrogen, San Diego, Calif. U. S. A. (el kit MAXBAC®), y tales métodos son bien conocidos en la técnica, como se describió en Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), incorporado aquí como referencia. Las formas solubles de la proteína MU-1 también pueden ser producidas en células de insectos usando polinucleótidos aislados apropiados como se describió anteriormente.

Alternativamente, en la proteína agonista IL-21/IL-21R o proteína de fusión de la misma puede ser producida en eucariotas menores tales como levadura o procariotas como las bacterias. Las setas de levadura adecuadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, sepas *Kluyveromyces*, *Candida*, o cualquier sepa de levadura capaz de expresar proteínas heterólogas. Las sepas bacteriales adecuadas incluyen la *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, o cualquier sepa bacterial capaz de expresar proteínas heterólogas.

En una modalidad, IL-21 es producido en un bacterial sin una secuencia de señal (por ejemplo, sin una secuencia de señal procariótica o eucariótica) la expresión en las bacterias pueden resultar en la formación de cuerpo de inclusión que incorporan la proteína recombinante. Así, el redoblado de la proteína

recombinante puede ser requerido para poder producir material activo o más activo. Diversos métodos para obtener proteínas dobles heterólogas correctamente de cuerpos de inclusión bacterial son conocidos en la técnica. Estos métodos generalmente involucran la solubilización de la proteína a partir de los cuerpos de inclusión, entonces la desnaturalización de la proteína completamente usando un agente caotrópico.

Cuando residuos de cisteína están presentes en la secuencia de aminoácido principal de la proteína, la proteína puede ser redoblada en un ambiente que facilite la formación correcta de enlaces de disulfuro (por ejemplo, un sistema redox). Los métodos generales de redoblado son descritos en Kohno, Meth. Enzym., 185: 187-195 (1990). La EP 0433225 y U. S. 5,399, 677. Asano et al. (2002) FEBS Lett. 528 (1-3): 70-6 describe un método ilustrativo para redoblar IL-21 producido en células bacteriales. Por ejemplo, el rIL-21 (el IL-21 recombinante) es expresado como cuerpos de inclusión insolubles en el *E. coli*, entonces es solubilizado (por ejemplo, usando un desnaturalizante) y redoblado usando un método de diálisis modificado en el cual los reactivos redox son introducidos.

La proteína agonista de IL-21/IL-21R o proteína de fusión de la misma puede también ser expresada como un producto de animales transgénicos, por ejemplo, como un componente de la leche de vacas transgénicas, cabras transgénicas, cerdo transgénicos, u ovejas transgénicos que son caracterizadas por células somáticas o de germen que contienen una secuencia de polinucleótido que codifican la proteína agonista IL-21/IL-21R o la proteína de fusión de la misma.

La proteína agonista de IL-21/IL-21R o proteína de fusión de la misma puede también ser preparada por el crecimiento de un cultivo de células anfitrionas

transformadas bajo condiciones de cultivo necesarias para expresar la proteína deseada. La proteína expresada resultante puede ser entonces ser purificada a partir del medio de cultivo o de extractos de célula. Las formas solubles de la proteína agonista IL-21/IL-21R o proteína de fusión de la misma puede ser purificada a partir de medios acondicionados. Las formas de enlace de membrana de la proteína MU-1 puede ser purificada por medio de preparar una fracción de membrana total a partir de las células que expresan y extraer las membranas con un detergente no iónico tal como tritón X-100.

La proteína agonista de IL-21/IL-21R o proteína de fusión puede ser purificada usando métodos conocidos por aquellos versados en la técnica. Por ejemplo, a proteína agonista IL-21/IL-21R puede ser concentrada usando un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultra filtración AMICON® o MILLIPORE® PELLICON™. Luego de la etapa de concentración, el concentrado puede ser aplicado a una matriz de purificación tal como un medio de filtración por gel. Alternativamente, una resina de intercambio aniónico puede ser empleada, por ejemplo, una matriz o sustrato que tenga dietilaminoetil pendiente (DEAE) o grupos polietileneimina (PEI). Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextran, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en purificación de proteínas. Alternativamente, una etapa de intercambio catiónico puede ser empleada. Los intercambiadores de catión adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Los grupos sulfopropilos son los preferidos (por ejemplo las columnas con S-Sepharosa®). La purificación de la proteína MU-1 o proteína de fusión del sobrenadante del cultivo puede también incluir uno o más etapas de columna sobre tales resinas de afinidad como la concanavalina A-agarosa, heparin-TOYOPEARLO o Cibacrom blue 3GA SEPHAROSE; o por

cromatografía de de interacción hidrofóbica utilizando tales resinas tales como fenilo, feniléter, butiléter, o propiléter; o por cromatografía de inmutuafinidad. Finalmente uno o más cromatografías líquidas de alto desempeño de fase inversa (RP-HPLC) emplea en medio RP-HPLC hidrofóbico, por ejemplo, gel de sílice que tiene metil pendiente u otros grupos alifáticos, peden ser empleados para purificar adicionalmente la proteína agonista IL-21/IL-21R. Las columnas de afinidad incluyen anticuerpos para la proteína agonista IL-21/IL-21R también pueden ser usados en la purificación de acuerdo con métodos conocidos. Algunos o todos de las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones y con otros métodos conocidos, también pueden ser empleados para suministrar una proteína recombinante aislada sustancialmente purificada. Preferiblemente, la proteína agonista IL-21/IL-21R aislada es purificada de modo que está sustancialmente libre de otras proteínas de mamíferos o, si se produjo en bacterias, sustancialmente libre de otras proteínas bacteriales, por ejemplo las endotóxicas.

En otras modalidades los agonistas IL-21/IL-21R son anticuerpos, o fragmentos que ligan antígeno del mismo, que se ligan a, por ejemplo la IL-21/IL-21R, preferiblemente, la IL-21 o la IL-21R (por ejemplo humana o de murina), y activa una actividad de IL-21.

Como se usa aquí, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que comprende por lo menos uno, y preferiblemente dos, cadenas pesadas (H) de regiones variables (abreviadas aquí como VH), y en por lo menos uno y preferiblemente dos regiones variables de cadena liviana (L) (abreviada aquí como VL). Las regiones VH y VL pueden ser subdivididas adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas "regiones determinantes complementarias" ("CDR"), interdispersadas con regiones que son más conservadas, llamadas "regiones de

trabajo" (FR). La extensión de la región de trabajo y el CDR han sido definidos precisamente (ver, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, y Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917, que son incorporadas aquí como referencia). Cada VH y VL está compuesto de tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde términos amino a terminales carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

El anticuerpo puede incluir adicionalmente una región constante de cadena pesada y liviana, para así formar una cadena de inmunoglobulina pesada y liviana, respectivamente. En una modalidad, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas de inmunoglobulina pesadas y dos cadenas de inmunoglobulina livianas, en donde las cadenas de inmunoglobulina pesadas y livianas están interconectadas por, por ejemplo, enlaces de disulfuro. La región constante de cadena pesada está comprendida de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. La región constante de cadena liviana está comprendida de un dominio, CL. La región variable de las cadenas pesada y liviana contiene un dominio de enlace que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos que típicamente median el enlazado del anticuerpo a los tejidos anfitriones o factores, incluyen diversas células del sistema inmune (por ejemplo células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema complemento clásico.

Como se ha usado aquí, el término "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste de uno o más polipéptidos que sustancialmente son codificados por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina humana reconocidos influyen el kappa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3,

125
135

IgG4), delta, epsilon y mu de genes de región constante, lo mismo que genes de región variable de inmunoglobulina como miriadas. Las "cadenas livianas" de inmunoglobulina de longitud completa (cerca de 25 Kd o 214 aminoácidos) son codificados por un gen de región variable en el terminal NH₂ (cerca de 110 aminoácidos) y un gen de región constante Kappa o lambda en el terminal COOH. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina de longitud completa (cerca de 50 Kd o 446 aminoácidos), son codificadas similamente por un gen de región variable (cerca 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de región constante anteriormente mencionados, por ejemplo e. g., gamma (que codifica cerca de 330 aminoácidos).

Como se utiliza aquí, "isotipo" se refiere a las clases de anticuerpo (por ejemplo IgM o IgG1) que es codificado por genes región constante de cadena pesada.

El término "fragmento que liga antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo", o "fragmento"), como se usa aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa que retiene la habilidad para ligar específicamente a un antígeno (por ejemplo, IL-21R). Ejemplos de fragmentos que ligan involucrados dentro del término "fragmento que liga antígeno" de un anticuerpo incluye (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de dominios VL, VH, CL y CH₁; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente de disulfuro en la región de articulación; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH₁; y (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341: 544-546), que consiste de un dominio VH; y (vi) una región determinante complementaria aislada (CDR). Más aún, aunque los dos

dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, ellos pueden ser unidos, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permita estar hechos como una cadena de proteína única en la cual el par de regiones VL y VH forman moléculas monovalentes (conocidas como cadena única Fv (scFv); ver por ejemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242: 423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Tales anticuerpos de cadena única también tienen el propósito de estar involucrados dentro del término "fragmento que liga antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo son obtenidos utilizando técnicas convencionales conocidas por aquellos versados en la técnica, y los fragmentos son separados en cuanto a su utilidad de la misma manera que son los anticuerpos intactos. Una región variable de inmunoglobulina "efectivamente humana" es una región variable de inmunoglobulina que incluye un número suficiente de cuadros humanos de posiciones de aminoácido tal que la región variable de inmunoglobulina no produce una respuesta inmunogénica en un humano normal. Un anticuerpo "efectivamente humano" es un anticuerpo que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácido humanos tal que el anticuerpo no produce una respuesta inmunogénica en un humano normal. Las regiones variables de inmunoglobulina humana y efectivamente humana y sus anticuerpos pueden ser usados.

Las proteínas IL-21 o IL-21R pueden ser usadas para inmunizar animales (por ejemplo animales no humanos y animales no humanos que incluyen genes de inmunoglobulina humana) para obtener anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionen específicamente con la proteína de agonista de IL-21/IL-21R y que puedan activar un IL-21R. Tales anticuerpos pueden ser obtenidos usando la proteína agonista IL-21/IL-21R completa como un inmunogen, o por medio de usar fragmentos de IL-21/IL-21R. Los inmunogenes del péptido adicionalmente pueden

137

contener un residuo de cisteína en el terminal carboxilo, y son conjugados a un hapteno tal como un agujero clave de lapa de hemocianina (KLH). Los inmunogenes de péptido adicionales pueden ser generados reemplazando los residuos de tirosina con residuos de tirosina sulfatada. Los métodos para sintetizar tales péptidos son conocidos en la técnica, por ejemplo, como en R. P. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963); J. L. Krstenansky, et al., FEBS Lett. 211, 10 (1987).

Los anticuerpos monoclonales humanos (mAbs) dirigidos contra IL-21 o IL21R pueden ser generados usando ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana en vez del sistema de ratón. Los esplenocitos de estos ratones transgénicos inmunizados con el antígeno de interés son usados para producir hibridomas que secretan el mAbs humano con afinidades específicas para epitopes de una proteína humana (ver, por ejemplo, WO 91/00906, WO 91/10741; WO 92/03918; WO 92/03917; Lonberg, N. et al. 1994 *Nature* 368: 856-859; Green, L. L. et al. 1994 *Nature Genet.* 7: 13-21; Morrison, S. L. et al. 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855; Bruggeman et al. 1993 *Year Immunol* 7: 33-40; Tuallion et al. 1993 *PNAS* 90: 3720-3724; Bruggeman et al. 1991 *Eur J Immunol* 21 : 1323-1326).

Los anticuerpos monoclonales también pueden ser generados por otros métodos conocidos por aquellos versados en la técnica de la tecnología de ADN recombinante. Un método alternativo, referido como el método "de visualización de anticuerpo combinatorial", ha sido desarrollado para identificar y aislar fragmentos de anticuerpo que tienen una especificidad de antígeno particular, y que pueden ser utilizados para producir anticuerpos monoclonales (para las descripciones de visualización de anticuerpo combinatorial ver por ejemplo, Sastry et al. 1989 *PNAS*

86: 5728; Huse et al. 1989 *Science* 246: 1275; y Orlandi et al. 1989 *PNAS* 86: 3833). Después de inmunizar un animal con un inmunogen como se describió anteriormente, el repertorio de anticuerpo de la piscina de células B resultante es clonado. Los métodos son generalmente conocidos para la obtención de la secuencia de ADN de las regiones variables de una población diversa de moléculas de inmunoglobulina por medio de usar una mezcla de cebadores de oligómero y PCR. Por ejemplo, cebadores de oligonucleótidos mezclados correspondientes al líder 5' (péptido de señal) y/o secuencias de estructura 1 (FR1), lo mismo que el cebador de un cebador de región constante conservado en 3' puede ser usado para la amplificación PCR de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de un número de anticuerpos de muridos (Larrick et al., 1991, *Biotechniques* 11: 152-156). Una estrategia similar puede también ser usada para amplificar regiones variables de cadenas pesada y liviana humanas de anticuerpos humanos (Larrick et al., 1991, *Methods: Companion to Methods in Enzymology* 2: 106-110).

Los anticuerpos quiméricos, incluyendo cadenas de inmunoglobulina quimérica, pueden ser producidos por técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Por ejemplo, un gen que codifica la región constante Fc de un murido (u otras especies) de la molécula de anticuerpo monoclonal es digerida con enzimas de restricción para remover la región que codifica el Fc del murido, y la porción equivalente de un gen que codifica una región constante Fc humana es sustituida (ver Robinson et al., Publicación de Patente Internacional PCT/US86/02269; Akira, et al., Solicitud de Patente Europea 184, 187; Taniguchi, M., Solicitud de Patente Europea 171,496; Morrison et al., Solicitud de Patente Europea 173,494; Neuberger et al., Solicitud Internacional WO 86/01533; Cabilly et al. Patente U. S. No. 4,816, 567; Cabilly et al., Solicitud de Patente Europea 125,023; Better et al.

13A

(1988 *Science* 240: 1041-1043); Liu et al. (1987) *PNAS* 84: 3439-3443; Liu et al., 1987, *J Immunol.* 139: 3521-3526; Sun et al. (1987) *PNAS* 84: 214-218; Nishimura et al., 1987, *Canc. Res.* 47: 999-1005; Wood et al. (1985) *Nature* 314: 446-449; y Shaw et al., 1988, *J. Natl Cancer Inst.* 80: 1553-1559).

Un anticuerpo o una cadena de inmunoglobulina pueden ser humanizados por métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos humanizados, incluyen cadenas de inmunoglobulina humanizada, pueden ser generados por medio de reemplazar las secuencias de la región variable Fv que no se involucran directamente en ligar el antígeno con secuencias equivalentes de regiones variables Fv humanas. Los métodos generales para generar anticuerpos humanizados están provistos por Morrison, S. L., 1985, *Science* 229: 1202-1207, por Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4: 214, y por Queen et al. US 5,585,089, US 5,693,761 y US 5,693,762, los contenidos de los cuales se incorporan aquí como referencia. Aquellos métodos incluyen aislar, manipular, y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican todo o parte de las regiones variables Fv de inmunoglobulina de por lo menos uno de una cadena pesada o liviana. Las fuentes de tales ácidos nucleicos son bien conocidas por aquellos versados en la técnica y, por ejemplo, pueden ser obtenidos a partir de un hibridoma que produce un anticuerpo contra un objetivo predeterminado. El ADN recombinante que codifica el anticuerpo humanizado, o fragmento del mismo, puede entonces ser clonado en un vector de expresión apropiado.

Las moléculas de anticuerpo CDR injertadas o humanizadas o las inmunoglobulinas pueden ser producidas por injerto CDR o sustitución CDR, en donde uno, dos, o todos los CDR de una cadena de inmunoglobulina pueden ser reemplazados. Ver, por ejemplo, la Patente Estadounidense 5,225,539; Jones et

140

al. 1986 Nature 321: 552-525; Verhoeyan et al. 1988 Science 239: 1534; Beidler et al. 1988 J. Immunol. 141: 4053-4060; Winter US 5,225,539, Los contenidos de los cuales se incorporan expresamente aquí como referencia. Winter describe un método de injerto CDR que puede ser usado para preparar los anticuerpos humanizados (Solicitud de Patente Británica GB 2188638A, presentada en Marzo 26, 1987; Winter US 5,225,539), los contenidos de los cuales se incorporan expresamente como referencia. Todos los CDR de un anticuerpo humano particular pueden ser reemplazados con por lo menos una porción de un CDR no humano o solamente algunos de los CDR pueden ser reemplazados con CDR no humano. Solamente es necesario reemplazar el número de CDR requeridos para el ligado del anticuerpo humanizado a un antígeno determinado.

En algunas implementaciones, los anticuerpos monoclonales, quiméricos y humanizados pueden ser modificados por, por ejemplo, eliminación, agregación o sustitución de otras porciones del anticuerpo, por ejemplo la región constante. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser modificado como sigue: (i) por medio de eliminar la región constante; (ii) por medio de reemplazar la región constante con otra región constante, por ejemplo una región constante que incremente la vida promedio, la estabilidad o la afinidad del anticuerpo, o una región constante de otra especie o clase de anticuerpo, o (iii) por medio de modificar uno o más aminoácidos en la región constante para alterar, por ejemplo, el número de sitios de glicosilación, función de célula detectora, ligado de receptor Fc (FcR), fijación de complemento, entre otros.

Los métodos para alterar una región constante de anticuerpos son conocidas en la técnica. Los anticuerpos con función alterada, por ejemplo afinidad alterada para un ligando efector, tal como el FcR sobre una célula, o el componente C1 del

complemento puede ser producido por medio de reemplazar por lo menos un residuo de aminoácido en la porción constante del anticuerpo con un residuo diferente (ver por ejemplo, EP 388,151 A1, US 5,624,821 y US 5,648,260). Un tipo similar de alteraciones podría ser descrito el cual si se aplica a la murina u otras especies de monoglobulina reduciría o eliminaría estas funciones.

Por ejemplo, es posible alterar la afinidad de una región Fc de un anticuerpo (por ejemplo un IgG, tal como un IgG humano) para un FcR (por ejemplo, Fc gamma R1), o para un ligando de C1q por medio de reemplazar los residuos específico(s) con un residuo o residuos que tienen una funcionalidad apropiada sobre su cadena lateral, o por medio de introducir un grupo funcional cargado, tal como glutamato o aspartato, o quizás un residuo no polar aromático tal como fenilalanina, tirosina, triptofan or alanina (ver por ejemplo, US 5,624,821).

En una modalidad, un agonista de IL-21R es un agente que interactúa con IL-21R y otra subunidad receptora, por ejemplo γc . Por ejemplo, el agente puede ser una proteína que interactúa con IL-21R y otra subunidad receptora, por ejemplo γc . La proteína puede ser, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico que incluye un sitio de ligando de antígeno que interactúa con IL-21R y otro sitio de ligando de antígeno que interactúa con γc . El ligando de tales proteínas puede ser usado para reticular y agonizar el receptor, por ejemplo activar o incrementar las señalizaciones STAT3 o STAT5.

En una modalidad, un agonista IL-21/IL-21R es un agente (por ejemplo, una inmunoglobulina) que estabiliza una interacción con IL-21/IL-21R, por ejemplo, por medio de ligar uno o ambos de IL-21 e IL-21R.

142

Los agonistas de las proteínas IL-21/IL-21R pueden ser separadas para, por ejemplo, ligar y/o la activación de un polipéptido IL-21R usando los procedimientos conocidos en la técnica. Los ensayos de ligado usando una proteína de ligado deseada, inmovilizada o no, son conocidos en la técnica y pueden ser usados para este propósito usando la proteína IL-21R como se describió aquí. La célula purificada con base en la proteína (célula libre) en los ensayos de separación puede ser usada para identificar tales agonistas. Por ejemplo, la proteína IL-21R puede ser inmovilizada en una forma purificada sobre un vehículo y ligandos potenciales a la proteína IL-21R purificada pueden ser medidos. Los ensayos con base en la célula para evaluar la actividad del IL-21R y las señalizaciones STAT3 o STAT5 son conocidos. Ejemplos se describen aquí.

Composiciones Farmacéuticas

Los agonistas IL-21/IL-21R pueden ser usados como composiciones farmacéuticas cuando son combinadas con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal composición puede contener, adicionalmente a los agonistas IL-21/IL-21R y el vehículo, diversos diluyentes, cargas, sales, amortiguadores, estabilizadores, solubilizadores, y otros materiales bien conocidos en la técnica. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica del ingrediente activo. Las características del vehículo dependerán de la junta de administración.

La composición farmacéutica puede contener adicionalmente otros agentes antiinflamatorios como se describe en más detalle adelante. Tales factores adicionales y/o agentes pueden ser incluidos en la composición farmacéutica para producir un efecto sinérgico con un agonista IL-21/IL-21R, o para minimizar

efectos colaterales causados por lo agonistas IL-21/IL-21R. Inversamente, los agonistas IL-21/IL-21R pueden ser incluidos en formulaciones del agente antiinflamatorio particular para minimizar los efectos colaterales del agente antiinflamatorio.

La composición farmacéutica puede estar en la forma de un liposoma en la cual los agonistas IL-21/IL-21R son combinados, en adición con otros vehículos farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos tales como lípidos que existen en forma agregada como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, o capas lamelares las cuales están en solución acuosa. Los lípidos adecuados para la formulación liposomal incluye, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácido biliar, y similares. La preparación de tales formulaciones liposomales están dentro del nivel experto en la técnica, según se describió, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 4,235,871; Patente Estadounidense No. 4,501,728; Patente Estadounidense No. 4,837,028; y Patente Estadounidense No. 4,737,323, todas las cuales se incorporan aquí como referencia.

Como se usa aquí, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o método que es suficiente para mostrar un beneficio significativo al paciente, por ejemplo, el mejoramiento de los síntomas de, la curación de o el incremento en el índice de curación de tales condiciones. Cuando se ha aplicado a un ingrediente activo individual, administrado solo, el término se refiere a ese ingrediente solo. Cuando es aplicado a una combinación, el término se refiere a las cantidades combinadas de los ingredientes activos que resulta en el efecto terapéutico, sin importar si es administrado en combinación, serialmente o simultáneamente.

144

Al practicar el método de tratamiento o uso, una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista IL-21/IL-21R es administrado a un sujeto, por ejemplo, mamífero (por ejemplo un humano). Un agonista IL-21/IL-21R puede ser administrado solo o en combinación con otras terapias tal como tratamientos que emplean agentes antiinflamatorios. Cuando es co administrado con uno o más agentes, un agonista IL-21 y/o IL-21R puede ser administrado sea simultáneamente con el segundo agente, o secuencialmente. Si es administrado secuencialmente, el médico puede decidir que la secuencia apropiada de administración de un agonista IL-21/IL-21R en combinación con otros agentes. La administración de un agonista IL-21/IL-21R usado en la composición farmacéutica o para practicar el método de la presente invención puede llevarse a cabo de una variedad de maneras convencionales, tal como ingestión, oral, intracraneal, inhalación, o inyección o administración cutánea, subcutánea o intravenosa. Por ejemplo, la composición puede ser suministrada como un epidural o de otra manera, por ejemplo, al fluido cerebroespinal.

Cuando una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista IL-21/IL-21R es administrada oralmente, el agente de ligado estará en la forma de una tableta, cápsula, polvo, solución o elixir. Cuando es administrado en forma de tableta, la composición farmacéutica puede contener adicionalmente un vehículo sólido tal como una gelatina o un adyuvante. La tableta, cápsula, y el polvo contienen entre cerca de 5 a 95% del agente ligante, y preferiblemente entre cerca de 25 a 90% del agente de ligado. Cuando es administrado en forma líquida, un portador líquido o vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites de origen animal o de plantas tales como aceite de maní, aceite mineral, aceite de soja, o aceite sésamo, o aceites sintéticos pueden ser agregados o aceites sintéticos pueden ser

[Handwritten signature]
145

agregados. La forma líquida de la composición farmacéutica puede contener adicionalmente solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol o propilenglicol. Cuando es administrado en forma líquida, la composición farmacéutica contiene entre cerca de 0,5 a 90% en peso del agente de ligado, y preferiblemente entre cerca de 1 a 50% del agente de ligado.

Cuando una cantidad terapéuticamente efectiva de un agonista IL-21/IL-21R es administrada por medio de inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, el agente de ligado estará en la forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable libre de pirógeno. La preparación de tal solución de proteína parenteralmente aceptable, que debido al pH, isotonicidad, estabilidad y similares, está dentro del alcance de la técnica. Una composición farmacéutica preferida para una inyección intravenosa, cutánea o subcutánea debe contener adicionalmente al agente de ligado un vehículo isotónico, tal como una inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, inyección de Ringer lactada, u otro vehículo según es conocido en la técnica. La composición farmacéutica de la presente invención puede también contener estabilizadores, preservativos, amortiguadores, antioxidantes, u otro aditivo conocido por aquellos versados en la técnica.

La cantidad de un agonista IL-21/IL-21R en la composición farmacéutica de la presente invención puede depender de la naturaleza y severidad de la condición que está siendo tratada, o de la naturaleza de tratamientos anteriores haya tenido. El médico que atiende puede decidir la cantidad de agonista con la cual tratar cada paciente individual. Inicialmente, por ejemplo, el médico puede administrad dosis bajas del agente de ligado y observar la respuesta del paciente. Dosis más

grandes del agente de ligado deben ser administradas hasta que el efecto terapéutico óptimo es obtenido para el paciente, y en ese punto la dosificación no se incrementa generalmente más o por medio de monitorear los niveles de citosina o uno o más de los síntomas. Se ha contemplado que en diversas composiciones farmacéuticas usadas para practicar el método de la presente invención deben contener entre cerca de 0,1 μ g a cerca de 100 mg del agonista IL-21/IL-21R por kg de peso corporal.

Por ejemplo, las dosificaciones pueden incluir entre cerca de 10 μ g – 1 mg, 0,1 - 5 mg, y 3 - 50 mg del agonista IL-21/IL-21R por kg de peso corporal. Las dosificaciones útiles de IL-21 pueden adicionalmente incluir entre cerca de 5 μ g – 1 mg, 5 μ g – 1 mg, 0,1 – 5 mg, y 3 - 20 mg de antagonista IL-21/IL-21R por kg de peso corporal.

La duración de la terapia intravenosa usando la composición farmacéutica puede variar, dependiendo de la severidad de la enfermedad que está siendo tratada y la condición y respuesta idiosincrásica potencial de cada paciente individual. La duración de cada aplicación del agonista IL-21/IL-21R puede estar, por ejemplo, en el rango de 12 a 24 horas de administración intravenosa continua. El médico que atiende puede decidir la duración apropiada de la terapia intravenosa utilizando la composición farmacéutica de la presente invención.

Adicionalmente a los agonistas IL-21/IL-21, en donde tales agonistas son proteínas, la enfermedad o desorden puede ser tratada o prevenida por medio de la administración o uso de polinucleótidos que codifican tales proteínas (tal como por ejemplo terapias de gen o vectores adecuados APRA introducción del ADN).

Usos de los agonistas IL-21/IL-21R para promover una respuesta inmune

En un aspecto, la presente invención suministra métodos para tratar (por ejemplo curar, suprimir, mejorar, retardar o impedir el ataque de, o impedir la recurrencia o relapso de (o prevenir un desorden inmunológico del sistema nervioso) por ejemplo, un desorden inmunológico crónico del sistema nervioso, incluyendo esclerosis múltiple), en un sujeto. El método incluye: administrar al sujeto un agonista IL-21/IL-21R, en una cantidad suficiente para modular la actividad celular inmune y/o el número celular (por ejemplo para modular niveles de citosina, ejemplo, expresión de citosina, producción y/o liberación de citosina), tratando así o impidiendo el desorden inmunológico del sistema nervioso, por ejemplo la esclerosis múltiple.

La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad del sistema nervioso central que está caracterizado por la inflamación y pérdida de las cubiertas de mielina – el material grasoso que aísla los nervios y es necesaria para la función adecuada del nervio. La inflamación que resulta de una respuesta inmune que es modulada por un IL-21 puede ser impedida o tratada con los agonistas IL-21/IL-21R descritos aquí. En un modelo de ratón de encefalitis autoinmune experimental (EAE) para esclerosis múltiple (Tuohy et al. (J. Immunol. (1988) 141: 1126 - 1130), Sobel et al. (J. Immunol. (1984) 132: 2393 - 2401), y Traugott (Cell Immunol. (1989) 119: 114 - 129), tratamiento de ratones con inyecciones de IL-21 antes de la inyección del EAE reduce los síntomas de la enfermedad. De acuerdo con lo anterior, los agonistas IL-21/IL-21R descritos aquí puede similarmente ser usados para tratar o evitar la esclerosis múltiple en humanos.

Pacientes adecuados para tal tratamiento pueden ser identificados por criterios que establecen un diagnóstico de MS definitivo clínicamente según se definió en el trabajo sobre el diagnóstico de MS (Poser et al., Ann. Neurol. 13: 227, 1983). Brevemente, un individuo con MS definitivo clínicamente ha tenido dos ataques y evidencia clínica de una lesión y evidencia para clínica de otra, lesión separada. El MS definitivo puede también ser diagnosticado por la evidencia de dos ataques y tandas oligoclonales de IgG en el fluido cerebroespinal o por la combinación de un ataque, evidencia clínica de dos lesiones y la banda oligoclonal de IgG en el fluido cerebroespinal. Criterios ligeramente inferiores son usados para el diagnóstico de MS químicamente probable.

El tratamiento efectivo de la esclerosis múltiple puede ser examinado de diferentes maneras. Satisfacer cualquiera de los siguientes criterios de evidencia de tratamiento efectivo. Se utilizan tres criterios principales diferentes: EDSS (escala de estado de inhabilidad extendida), aparición de exacerbaciones o MRI (formación de imágenes por resonancia magnética). El EDSS es un medio para graduar el deterioro clínico debido al MS (Kurtzke, Neurology 33: 1444, 1983). Ocho sistemas funcionales son evaluados para el tipo y severidad del deterioro neurológico. Brevemente, antes del tratamiento, los pacientes son evaluados en cuanto al deterioro en los siguientes sistemas: piramidal, cerebelo, tallo cerebral, sensorial, vaso y riñones,, visual, cerebral, y otros. Seguimientos que conducen a intervalos definidos. Los rangos de la escala de 0 (normal) a 10 (muerte debido a MS). Una disminución de una etapa completa define un tratamiento efectivo en el contexto de la presente invención (Kurtzke, Ann. Neurol. 36: 573-79, 1994). Las exacerbaciones son definidas como la aparición de un nuevo síntoma que es atribuible al MS y acompañado por una anomalía neurológica nueva apropiada (IFNB MS Study Group, supra). Adicionalmente, la exacerbación puede durar por

lo menos 24 horas y estar precedida por la estabilidad o mejoramiento durante por lo menos 30 días. Brevemente, a los pacientes se les hace un examen neurológico estándar por los médicos internos. Las exacerbaciones pueden ser suaves, moderadas o severas de acuerdo con los cambios en una escala de graduación neurológica (Sipe et al., Neurology 34: 1368, 1984). Una velocidad de exacerbación anual y proporción de de pacientes libres de exacerbación se ha determinado. La terapia que se considera efectiva es si existe una diferencia estadísticamente significativa en la velocidad o proporción de los pacientes libres de exacerbación entre el grupo tratado y el grupo placebo para cualquiera de estas medidas. Adicionalmente, el tiempo de la primera exacerbación y la duración de la exacerbación y severidad también pueden ser medidas. Una medida de efectividad como terapia a este respecto es una diferencia estadísticamente significativa en el momento hacia la primera exacerbación o duración y severidad en el grupo tratado comparado con el grupo de control.

El MRI puede ser usado para medir lesiones activas usando imágenes mejoradas de gadolinio DTPA (McDonald et al. Ann. Neurol. 36: 14, 1994) o la localización y grado de las lesiones usando técnicas de pesado T₂. En resumen, se obtienen los MRI. El plano de la sima imagen del plano y la posición del paciente son usados para cada estudio posterior. Las secuencias de posicionamiento e imágenes pueden ser escogidas para maximizar la detección de la lesión y facilitar el trazado de la lesión. Las mismas secuencias de posicionamiento e imagen pueden ser usadas en estudios posteriores. La presencia, localización y grado de lesiones por MS pueden ser determinadas por los radiólogos. Las áreas de lesión pueden ser diseñadas y divididas sumadas por la división para el área total de la lesión. Se pueden hacer tres análisis: evidencia de nuevas lesiones, proporción de aparición de lesiones activas, porcentaje de cambio en el área de lesión (Paty et al.,

150

Neurology 43: 665,1993). El mejoramiento debido a la terapia puede ser establecido por una mejora estadísticamente significativa en un paciente individual comparado con la línea base o en grupo tratado contra un grupo placebo.

Síntomas ilustrativos asociados con la esclerosis múltiple incluyen: neuritis óptica, diplopia, nistagmus, dismetría ocular, oftalmoplegia interanuclear, fosfenos de movimiento y sonido, defecto pupilar aferente, paresis, monoparesis, paraparesis, hemiparesis, cuadraparesis, plejía, paraplejía, hemiplejía, tetraplejía, cuadruplejía, espasticidad, disartria, atrofia muscular, espasmos, calambres, hipotonía, clonus, mioclonus, mioquimia, síndrome de pierna dormida, calda de pie, reflejos disfuncionales, paraestesia, anestesia, neuralgia, dolor neuropático y neurogénico, l'hermitte's, disfunción propioceptiva, neuralgia trigeminal, ataxia, temblor de intención, dismetria, vestibular ataxia, vértigo, ataxia del habla, distonia, disdiadocoquinesia, micturación frecuente, espasticidad de vejiga, flacidez de vejiga, dissinergia detrusora de esfínter, disfunción eréctil, anorgasmia, frigidez, constipación, urgencia peccal, incontinencia fecal, depresión, disfunción cognitiva, demencia, movimientos de balanceo suave, labilidad emocional, euforia, síndrome bipolar, ansiedad, afasia, disfasia, fatiga, síntoma uhthoff, reflujo gastroesofageal, y desórdenes de sueño.

Pacientes candidatos para la prevención deben ser identificados por la presencia de factores genéticos. Por ejemplo, una mayoría de los pacientes con MS tienen HLA-tipo DR2a y DR2b. Los pacientes con MS tienen disposiciones genéticas al MS quienes están adecuadas para el tratamiento caen dentro de dos grupos. Primero son pacientes con enfermedad temprana del tipo remitente y que recae. La entrada de los criterios puede incluir la duración de la enfermedad de más de un año, la marcación EDSS de 1,0 a 3,5, la rata de exacerbación de más de 0,5

por año, y libre de exacerbaciones clínicas durante dos meses antes del estudio. El segundo grupo incluiría gente con progreso de la enfermedad mayor a 1,0 EDSS unidades/año durante los pasados dos años. Los pacientes candidatos para la prevención pueden ser identificados evaluando los parámetros de citosina, por ejemplo, un parámetro IL-10 o IL-21.

La eficacia del agonista IL-21/IL-21R en el contexto de la prevención es juzgada con base en el criterio siguiente: frecuencia de células T reactivas MBP determinadas por dilución limitativa, respuesta de proliferación de líneas y clones de células T reactivas MBP, perfiles de citosina de las líneas de células T y clones para el MBP establecido de los pacientes. La eficacia es establecida por la disminución en la frecuencia de las células reactivas, una reducción en la incorporación de timidina con el péptido alterado comparado al nativo, y una reducción en TFN e IFN- α . Las medidas clínicas incluyen la velocidad de relapso en un intervalo de uno o dos años, y un cambio en EDSS, incluyendo el tiempo de progresión desde la línea base de 1,0 unidades sobre el EDSS el cual persiste durante seis meses. Sobre una curva Kaplan-Meier, un retardo en la progresión sostenida de inhabilidad muestra eficacia. Otro criterio incluye un cambio en el área y en el volumen de las imágenes T2 sobre MRI, y el número y volumen de lesiones determinadas por imágenes mejoradas por gadolinio.

En una modalidad, los agonistas IL-21/IL-21R, por ejemplo composiciones farmacéuticas de los mismos, son administrados en terapia de combinación, es decir, combinados con otros agentes, por ejemplo agentes terapéuticos, los cuales son útiles para tratar condiciones patológicas o desórdenes patológicos, tales como desórdenes de inmune e inflamatorios del cerebro, por ejemplo, esclerosis múltiple. El término "en combinación" en este contexto significa que los agentes se

152

dan sustancialmente contemporáneos, sea simultáneamente o secuencialmente. Si se dan secuencialmente, en el establecimiento de la administración del segundo compuesto, el primero de los dos compuestos es preferiblemente todavía detectable a concentraciones efectivas en el sitio de tratamiento.

Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir uno o más agonistas IL-21/IL-21R (por ejemplo un polipéptido o proteína de fusión IL-21, un agonista de péptido o un agonista de molécula pequeña) co-formulado con, y/o co-administrado con, uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, una o más citocinas e inhibidores de factor de crecimiento, inmunosupresores, agentes anti-inflamatorios, inhibidores metabólicos, inhibidores de enzimas, y/o agentes citotóxicos o citoestáticos, como se describe en más detalle adelante. Más aún, uno o más agonistas IL-21/IL-21R descritos aquí pueden ser usados en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos descritos aquí. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosificaciones más bajas de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las varias monoterapias. Más aún, los agentes terapéuticos descritos aquí actúan sobre trayectos que difieren del trayecto receptor IL-21/IL-21R, y por lo tanto se espera que promuevan y/o sinergizen con los efectos de los agonistas IL-21/IL-21R. Los agentes terapéuticos preferidos usados en combinación con un agonista IL-21/IL-21R son aquellos agentes que interfieren en diversas etapas en la respuesta autoinmune y subsiguiente inflamatoria.

Ejemplos no limitativos de agentes para tratar o prevenir esclerosis múltiple con los cuales un agonista IL-21/IL-21R puede ser combinado incluyen los siguientes: interferones, por ejemplo, interferón-beta-1a (por ejemplo, AVONEXTM; Biogen) e

153

interferón- β (BETASERONTM; interferón β humano sustituido en la posición 17; Berlex/Chiron); acetato de glatirámico (también llamado Copolímero 1, Cop-1; COPAXONETM; Teva Pharmaceutical Industries, Inc.); oxígeno hiperbárico; inmunoglobulina intravenosa; clabribina; antagonistas de TNF según se describe aquí; corticoesteroides; prednisolona; metilprednisolona; azatioprina; ciclofosfamida; ciclosporina; metotrexato; 4-aminopiridina; y tizanidina. Los antagonistas adicionales que pueden ser usados en combinación con los agonistas de IL-21 incluyen anticuerpos para, o antagonistas de, otras citocinas o factores de crecimiento humano, por ejemplo TNF, LT, IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-11, GM-CSF, FGF, y PDGF. Los agonistas de IL-21 como se describen aquí pueden ser combinados con anticuerpos para moléculas de superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80, CD86, CD90 o sus ligandos. Los agonistas de IL-21 también pueden ser combinados con agentes, tales como metotrexato, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSAID, por ejemplo, ibuprofeno, corticoesteroides tales como prednisolona, inhibidores de fosfodiesterasa, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inhibidores de complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interfieren con la señalización por citocinas proinflamatorias como se describe aquí, inhibidores de enzima que convierten IL- β (por ejemplo, Vx740), anti-P7, PSGL, inhibidores TACE, inhibidores de señalización de células T tales como inhibidores de quinasa, inhibidores de loproteinasa de metal, sulfasalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inhibidores de enzima que convierten angiotensina, receptores de citosina soluble y derivados de ellos, como se describe aquí, y citocinas anti-inflamatorias (por ejemplo IL-4, IL-10, IL-13 y TGF).

Ejemplos de agentes terapéuticos para tratar o prevenir la esclerosis múltiple con la cual los agonistas IL-21/IL-21R pueden ser combinados incluyen el interferón- β , por ejemplo, IFN β -1a e IFN β -1 β ; acetato de glatirámico (por ejemplo, COPAXONE), corticoesteroides, inhibidores de IL-1, inhibidores de TNF, anticuerpos para el ligando CD40 y CD80, y antagonistas de IL-12. Ejemplos adicionales incluyen agentes que pueden ser usados para tratar uno o más síntomas o efectos colaterales del MS, por ejemplo, amantadina, baclofen, aceite mineral, papaverina, meclizinae, hidroxizina, sulfametoxazol, ciprofloxacina, docusato, ciprofloxacina, pemolina, dantroleno, desmopresina, desmopresina, dexametasona, prednisona, tolterodina, fenitoína, oxibutinina, oxibutinina (fórmula de liberación extendida), bisacodil, venlafaxina, amitriptilina, laxativo suavizador docusato inodoro, fosfato de sodio, metenamina, . baclofen (intratecal), clonazepam, isoniazida, vardenafil, nitrofurantoin, psilium muciloide hidrofílico, alprostadil, gabapentin, mitoxantrona, oxibutinina, nortriptilina, paroxetina, hidróxido de magnesio, bromuro de propantelina, alprostadil, modafinil, fluoxetina, fenazopiridina, glicerina, metilprednisolona, carbamazepina, imipramina, diazepam, sildenafil, bupropion, tizanidina, y sertralina.

Ejemplos de aquellos agentes que incluyen antagonistas de IL-12, tales como anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o generados in vitro (o fragmentos que ligan antígenos de los mismos de los mismos) que ligan al IL-12 (preferiblemente el IL-12 humano), por ejemplo, el anticuerpo descrito en la WO 00/56772, Genetics Institute/BASF); inhibidores del receptor de IL-12, por ejemplo, anticuerpos para el receptor IL-12 humano; y fragmentos solubles del receptor IL-12, por ejemplo, receptor IL-12 humano. Ejemplos de antagonistas de IL-15 incluyen anticuerpos (o fragmentos que ligan antígeno del mismo) contra el IL-15 o su receptor, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o

155

generados *in vitro* para el IL-15 humano o su receptor, fragmentos solubles del receptor de IL-15, y proteínas que ligan IL-15. Ejemplos de antagonistas de IL-18 incluyen los anticuerpos, por ejemplo anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o generados *in vitro* (o fragmentos que ligan el antígeno del mismo), al IL-18 humano, fragmentos solubles del receptor IL-18, y proteínas que ligan el IL-18 (IL-18BP, Mallet et al. (2001) Circ. Res. 28). Ejemplos de antagonistas de IL-1 incluyen inhibidores de enzima que convierten la interleucina-1 (ICE), tales como Vx740, antagonistas de IL-1, por ejemplo, IL-1RA (ANIKINRA, AMGEN), sIL1RII (Immunex), y anticuerpos del receptor anti-IL-1 (o fragmentos que ligan el antígeno del mismo).

Ejemplos de antagonistas de TNF incluyen anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos o generados *in vitro* (o fragmentos que ligan antígeno de los mismos) al TNF (por ejemplo TNFa humano) tal como el D2E7, (anticuerpo TNFa humano, U.S. 6,258,562; BASF), CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356 (anticuerpo anti-TNFa humanizado; Celltech/Farmacia), cA2 (anticuerpo anti-TNFa quimérico; Remicade™, Centocor); fragmentos de anticuerpo anti-TNF (por ejemplo, CPD870); fragmentos solubles de los receptores de TNF, por ejemplo, receptores de TNF humano p55 o p75 o derivados de ellos, por ejemplo, 75 kDTNFR-IgG (receptor de TNF 75 kD-proteína de fusión IgG, ENBRELT™; Immunex; ver por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1994) Vol. 37, S295; *J. Invest. Med.* (1996) Vol. 44,235A), p55 kDTNFR-IgG (receptor de TNF 55 kD – proteína de fusión IgG (LENERCEPT™)); antagonista de enzima, por ejemplo, TNFa que convierte la enzima (TACE) inhibidores (por ejemplo, un derivado de ácido alfa-sulfonil hidroxámico, WO 01/55112, e inhibidor TACE N-hidroxiformamida GW 3333, -005, o -022); y TNF-bp/s-TNFR (proteína de ligado de TNF soluble; ver por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S284; *Amer. J.*

- 156

Physiol.-Heart and Circulatory Physiology (1995) Vol. 268, pp. 37-42). Los antagonistas de TNF preferidos son fragmentos solubles de los receptores de TNF, por ejemplo, receptores de TNF humanos p55 o p75 o sus derivados, por ejemplo, 75 kdTNFR-IgG, y los inhibidores TNFa que convierten la enzima (TACE).

En otras modalidades, los agonistas de IL-21/IL21R descritos aquí pueden ser administrados en combinación con uno o más de los siguientes: antagonistas IL-13, por ejemplo, receptores de IL-13 solubles (sIL-13) y/o anticuerpos contra el IL-13; antagonistas de IL-2, por ejemplo, DAB 486-IL-2 y/o DAB 389-IL-2 (proteínas de fusión IL-2; Seragen; ver por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1993) Vol. 36, 1223), y/o anticuerpos para IL-2R, por ejemplo, anti-Tac (anti-IL-2R humanizado; Protein Design Labs, *Cancer Res.* 1990 Mar 1; 50 (5): 1495-502). Todavía otra combinación incluye antagonistas de IL-21 en combinación con inhibidores anti-CD4 no vaciadores (IDEC-CE9. 1/SB 210396 (anticuerpo anti-CD4 primatizado no vaciador; IDEC/SmithKline). Todavía otras combinaciones preferidas incluyen antagonistas de trayectos co-estimulatorios del CD80 (B7.1) o CD86 (B7.2) que incluye anticuerpo, receptores solubles o ligandos antagonísticos; lo mismo que el ligando de glicoproteína p-selectina (PSGL), citocinas anti-inflamatorias, por ejemplo, IL-4 (DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; IL-10 recombinante DNAX/Schering); IL-13 y TGF, y agonistas de ellos (por ejemplo, anticuerpos agonistas).

En otras modalidades, uno o más agonistas de IL-21/IL-21R pueden ser co-formuladas con, y/o co-administradas con, una o más drogas anti-inflamatorias, inmunosupresores, o inhibidores metabólicos o enzimáticos. Los ejemplos no limitativos de las drogas o inhibidores que pueden ser usados en combinación con

157

los agonistas IL-21 descritos aquí, incluyen pero no se limitan a uno o más entre: drogas anti-inflamatorias no esferoidales (NSAIDs), por ejemplo, ibuprofeno, Tenidap (ver por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S280)), Naproxeno (ver por ejemplo, *Neuro Report* (1996) Vol. 7, pp. 1209-1213), Meloxicam, Piroxicam, Diclofenaco, e Indometacina; Sulfasalazinae (ver por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S281); corticoesteroides tales como prednisolona; drogas anti-inflamatorias supresivas de citocina (CSAIDs); biosíntesis de inhibidores de nucleótido, por ejemplo, inhibidores de biosíntesis de purina, antagonistas de folato (por ejemplo, metotrexato (N-[4-[[[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil] metilamino] benzoil]-L-ácido glutámico); e inhibidores de biosíntesis de pirimidina, por ejemplo, inhibidores dehidrogenasa de dihidroorotato (DHODH) (por ejemplo, leflunomida (ver por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S131; *Investigación de Inflamación* (1996) Vol. 45, pp. 103-107). Los agentes terapéuticos preferidos para uso en combinación con los antagonistas de IL-21/IL-21R incluyen NSAID, CSAID, inhibidores (DHODH) (por ejemplo, leflunomida), y antagonistas de folato (por ejemplo, metotrexato).

Ejemplos de inhibidores adicionales que incluyen uno o más entre: corticoesteroides (orales, inhalados y por inyección local); inmunosupresores, por ejemplo, ciclosporina, tacrolimus (FK- 506); e inhibidores de mTOR, por ejemplo, sirolimus (rapamicina) o derivados de rapamicina, por ejemplo, derivados de rapamicina soluble (por ejemplo, derivados de éster de rapamicina, por ejemplo, CCI-779 (Elit. L. (2002) *Current Opinion Investig. Drugs* 3(8): 1249-53; Huang, S. et al. (2002) *Current Opinion Investig. Drugs* 3(2): 295-304); agentes que interfieren con la señalización por las citocinas proinflamatorias tales como TNF α o IL-1 (por ejemplo IRAK, NIK, IKK, p38 o MAP inhibidores de quinasa); inhibidores

de COX2 por ejemplo, celecoxib y variantes de éste, MK-966, ver por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S81); inhibidores de fosfodiesterasa, por ejemplo, R973401 (inhibidor de fosfodiesterasa Tipo IV; ver por ejemplo, *Arthritis & Rheumatism* (1996) Vol. 39, No. 9 (suplemento), S282)); inhibidores de fosfolipasa, por ejemplo, inhibidores de fosfolipasa citosólica 2 (cPLA2) (por ejemplo, análogos de trifluorometil cetona (U.S. 6,350,892)); inhibidores de factor de crecimiento celular endotelial vascular o receptores de factor de crecimiento, por ejemplo, inhibidor de VEGF y/o inhibidor de VEGF-R; e inhibidores de angiogénesis. Los agentes terapéuticos preferidos para uso en combinación con los inmunosupresores antagonistas IL-21/IL-21R, por ejemplo, ciclosporina, tacrolimus (FK-506); e inhibidores de mTOR, por ejemplo, sirolimus (rapamicina) o derivados de rapamicina, por ejemplo, derivados de rapamicina soluble (por ejemplo, derivados de éster rapamicina, por ejemplo, CCI-779; inhibidores de COX2, por ejemplo, celecoxib y variantes de éste; e inhibidores de fosfolipasa, por ejemplo, inhibidores de fosfolipasa citosólica 2 (cPLA2) (por ejemplo, análogos de trifluorometil cetona).

Ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que pueden ser combinados con un agonista IL-21/IL-21R incluyen uno o más entre: 6-mercaptopurinas (6-MP); sulfasalazina de azatioprina; mesalazina; cloroquinina de olsalazina/hidroxiclороquina; pencilamina; aurotiomalato (intramuscular y oral); azatioprina; cohicina; agonistas de adrenoreceptor beta-2 (salbutamol, terbutalina, salmeteral); xantinas (teofilina, aminofilina); cromoglicato; nedocromil; cetotifen; ipratropium y oxitropium; micofenolato mofetil; agonistas de adenosina; agentes antitrombóticos; inhibidores de complemento; y agentes adrenérgicos.

159

Otro aspecto de la presente invención de acuerdo a lo anterior se relaciona con kits para llevar a cabo la administración combinada de los antagonistas IL-21/IL21R con otros compuestos terapéuticos. En una modalidad, el kit comprende uno o más agentes de ligado formulados en un vehículo farmacéutico, y por lo menos un agente, por ejemplo, agente terapéutico, formulado como es apropiado, en una o más preparaciones farmacéuticas separadas.

Ensayo para Evaluar los Niveles de Citocina

Cualquier ensayo estándar puede ser usado para evaluar los niveles de citosina en una muestra o un sujeto. Por ejemplo, la muestra puede ser obtenida de un sujeto o puede incluir células en cultivo. Las muestras ilustrativas pueden ser obtenidas o derivadas de uno o mas células, tejido, o fluidos del cuerpo tales como sangre, orina, fluido linfático, fluido cerebroespinal, o fluido amniótico, células cultivadas (por ejemplo, células de cultivo de tejidos), saliva bucal, enjuague bucal, inodoro, sales de tejido, y material biopsico (por ejemplo, aspiración de biopsido).

Los métodos para evaluar los niveles de citocina incluyen evaluar los ácidos nucleicos para detectar mRNA or cDNA que codifiquen una citosina de interés (por ejemplo, IL-10 o IL-21) o evaluar las proteínas para detectar la citosina misma. Los ácidos nucleicos pueden ser evaluados, por ejemplo, usando RT-PCR (por ejemplo, PCR cuantitativo) o microarreglos de ácido nucleico. Las Proteínas pueden ser evaluadas, por ejemplo, usando espectroscopía de masa o inmunoensayo.

El ELISA suministra una forma conveniente de inmunoensayo. Por ejemplo, Biosource International, Camarillo CA suministra reactivos de ensayo que pueden

160 

ser usados para detectar IL-10 con una sensibilidad de < 0.2 pg/ml y para IL-12 con una sensibilidad de < 2 pg/ml). Similarmente, R&D Systems suministra reactivos para detectar IFN-con una sensibilidad < 8 pg/ml o TGF-beta 1 con una sensibilidad de < 7 pg/ml.

SEARCHLIGHT™ Proteome Array System (Pierce, Boston Technology Center) suministra reactivos comprehensivos para evaluar citosina múltiples de una sola vez.

Estos métodos pueden ser usados para evaluar la administración de un agonista de IL-21/IL-21R . Por ejemplo, para determinar si tal agonista causa un cambio estadísticamente significativo en los niveles de una citosina, por ejemplo, la IFN γ o para determinar si es que causa cambios aceptables, por ejemplo, a un nivel en un rango de normal de una citosina, por ejemplo, IL-10 o IFN γ . La Información de la evaluación puede ser usada para modular la dosificación del agonista. Por ejemplo, si los niveles de IL-10 no fueron incrementados a niveles dentro del rango de un sujeto normal, la administración del agonista puede ser incrementada, por ejemplo, incrementando la dosificación o la frecuencia. De manera inversa, si los niveles de IL-10 se incrementaron mas allá del rango deseado, la administración del agonista puede ser disminuida, por ejemplo, por medio de disminuir la dosis o la frecuencia.

Ensayos para evaluar la Actividad de los Agonistas del IL-21/IL21R como Activadores Inmunes.

La actividad de los agonistas de IL-21/IL21R activadores de un sistema immune pueden, entre otros medios, ser medidos por los siguientes métodos: Ensayos

161

adecuados para citotoxicidad de timocito o esplenocito, incluyen aquellos descritos en: *Current Protocols in Immunology*, Ed por J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Capítulo 3, *In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function* 3.1-3. 19; Capítulo 7, *Immunologic studies in Humans*); Hermann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78: 2488-2492, 1981; Hermann et al., *J. Immunol.* 128: 1968- 1974, 1982; Handa et al., *J. Immunol.* 135: 1564-1572, 1985; Takai et al., *J. Immunol.* 137: 3494-3500, 1986; Takai et al., *J. Immunol.* 140: 508-512, 1988; Hermann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78: 2488-2492, 1981; Hermann et al., *J. Immunol.* 128: 1968-1974, 1982; Handa et al., *J. Immunol.* 135: 1564-1572, 1985; Takai et al., *J. Immunol.* 137: 3494-3500, 1986; Bowman et al., *J. Virology* 61: 1992-1998; Takai et al., *J. Immunol.* 140: 508-512, 1988; Bertagnoli et al., *Cellular Immunology* 133: 327-341, 1991; Brown et al., *J. Immunol.* 153: 3079-3092, 1994.

Ensayos para las respuestas de inmunoglobulinas de células T e isótopos de variación (los cuales identificarán, entre otros, las proteínas que modulan las respuestas de anticuerpos dependientes de células T y que afectan los perfiles Th1/Th2) incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Maliszewski, *J. Immunol.* 144: 3028-3033, 1990; and *Assays for B cell function: In vitro antibody production*, Mond, J. J. and Brunswick, M. In *Current Protocols in Immunology*. J. E. e. a. Coligan eds. Vol 1 pp. 3.8. 1-3.8. 16, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

Ensayos de reacción de linfocitos mezclados (MLR) los cuáles identificarán entre otros, las proteínas que generan las respuestas predominantemente Th 1 y CTL) incluyen, sin limitación aquellos descritos en: *Current Protocols in Immunology*, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub.

Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3. 19; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Takai et al., J. Immunol. 137: 3494-3500,1986; Takai et al., J. Immunol. 140: 508-512,1988; Bertagnolli et al., J. Immunol. 149: 3778-3783,1992.

Ensayos dependientes de células dendríticas (las cuales identificarán, entre otras, proteínas expresadas con células dendríticas que activan las células T candidas) incluye, sin limitación, aquellos descritos en: Guery et al., J. Immunol. 134: 536-544,1995; Inaba et al., Journal of Experimental Medicine 173: 549-559, 1991; Macatonia et al., Journal of Immunology 154: 5071-5079,1995; Porgador et al., Journal of Experimental Medicine 182: 255-260, 1995; Nair et al., Journal of Virology 67: 4062-4069,1993; Huang et al., Science 264: 961-965,1994; Macatonia et al., Journal of Experimental Medicine 169: 1255- 1264,1989; Bhardwaj et al., Journal of Clinical Investigation 94: 797-807,1994; and Inaba et al., Journal of Experimental Medicine 172: 631-640,1990.

Ensayos para la supervivencia/apoptosis de linfocitos (las cuales se identificarán, entre otros, proteínas que impiden la apoptosis después de la inducción superantígeno y las proteínas que regulan la homeostasis de linfocitos) incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Darzynkiewicz et al., Cytometry 13: 795-808,1992; Gorczyca et al., Leukemia 7: 659- 670,1993; Gorczyca et al., Cancer Research 53: 1945-1951,1993; Itoh et al., Cell 66: 233-243,1991; Zacharchuk, Journal of Immunology 145: 4037-4045,1990; Zamai et al., Cytometry 14: 891-897,1993; Gorczyca et al., International Journal of Oncology 1: 639-648,1992.

Ensayos para proteínas que influyen etapas tempranas de compromiso de células T y desarrollo de ellas que incluyen, sin limitación, aquellos descritos en:

Antica et al., Blood 84: 111-117, 1994; Fine et al., Cellular Immunology 155: 111-122, 1994; Galy et al., Blood 85: 2770-2778, 1995; Toki et al., Proc. Nat. Acad Sci. U. S. A. 88: 7548-7551, 1991.

Ensayos para evaluar la activación de STAT son descritos, por ejemplo. En Gilmour et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 10772-10776. Por ejemplo, las células evaluadas (por ejemplo, células tratadas con un agonista o un agonista candidato) pueden ser lisadas y las proteínas de tirosina fosforilada pueden ser inmunoprecipitadas con un anticuerpo anti-fosfotirosina. Entonces el material precipitado puede ser evaluado utilizando anticuerpos específicos para un componente de proyecto de señalización, un anticuerpo para la proteína STAT, por ejemplo, STAT5.

Ensayos para medir la actividad de los agonistas IL-21/IL21R como moduladores de la producción de citosina y proliferación/diferenciación celular.

La actividad de los agonistas IL-21/IL21 R como moduladores de la producción de citosina y de proliferación/diferenciación celular pueden ser ensayados usando algún número de ensayos de proliferación celular dependientes del factor de rutina para líneas de células que incluyen, sin delimitación, 32D, DA2, DAIG, T10, B9, B9/1 1, BaF3, MC9/G, M+ (preB M+), 2E8, RB5, DA1, 123, T1165, HT2, CTLL2, TF-1, Mo7e y CMK.

Los ensayos para la proliferación de células T o linfocitos o timocitos incluyen sin limitación aquellos descritos en: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for

164

Mouse Lymphocyte Function 3.1- 3.19; Capítulo 7, Immunologic studies in Humans); Takai et al., J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Bertagnolli et al., J. Immunol. 145: 1706-1712, 1990; Bertagnolli et al., Cellular Immunology 133: 327-341, 1991; Bertagnolli, et al., J. Immunol. 149: 3778- 3783, 1992; Bowman et al., J. Immunol. 152: 1756-1761, 1994.

Ensayos para la producción de citocina y/o proliferación de células del bazo, nódulo linfático, o timocitos, incluyen, sin limitación, aquellas descritas en: Polyclonal T cell stimulation, Kruisbeek, A. M. and Shevach, E. M. In Current Protocols in Immunology. J. E. e. a. Coligan eds. Vol 1 pp. 3.12.1-3.12.14, John Wiley and Sons, Toronto. 1994; and Measurement of mouse and human Interferon gamma, Schreiber, R. D. In Current Protocols in Immunology. J. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.8.1-6.8. 8, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

Ensayos para la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas y linfopoyéticas incluye, sin limitación, aquellas descritas en: Measurement of Human and Murine Interleukin 2 and Interleukin 4, Bottomly, K., Davis, L. S. and Lipsky, P. E. In Current Protocols in Immunology. J. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.3. 1-6.3. 12, John Wiley and Sons, Toronto. 1991; deVries et al., J. Exp. Med. 173: 1205-1211, 1991; Moreau et al., Nature 336: 690-692, 1988; Greenberger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 2931-2938, 1983; Measurement of mouse and human interleukin 6—Nordan, R. In Current Protocols in Immunology. J. E. e. a. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.6. 1-6.6. 5, John Wiley and Sons, Toronto. 1991; Smith et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83: 1857- 1861, 1986; Measurement of human Interleukin 1 I—Bennett, F., Giannotti, J., Clark, S. C. and Turner, K. J. In Current Protocols in Immunology. J. E. e. a. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.15. 1 John Wiley and Sons, Toronto. 1991; Measurement of mouse and human Interleukin 9—Ciarletta,

165

A., Giannotti, J., Clark, S. C. and Turner, K. J. In Current Protocols in Immunology. J. Coligan eds. Vol 1 pp. 6.13.1, John Wiley and Sons, Toronto. 1991.

Ensayos para las respuestas del clon de células T antígenos (las cuales se identificarán, entre otras, proteínas que afectan las interacciones de las células APC-T lo mismo que los efectos en las células T directos por la medición de la proliferación y la producción de citosina) incluyen, sin delimitación, aquellos descritos en: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W Strober, Pub. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (Chapter 3, In Vitro assays for Mouse Lymphocyte Function; Chapter 6, Cytokines and their cellular receptors; Chapter 7, Immunologic studies in Humans); Weinberger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77: 6091-6095, 1980; Weinberger et al., Eur. J. Immun. 11: 405-411, 1981; Takai et al., J. Immunol. 137: 3494-3500, 1986; Takai et al., J. Immunol. 140: 508-512, 1988.

En el siguiente ejemplo no limitativo, demostramos, inter alia, que el IL-21 resulta en protección parcial en un ratón EAE.

Ejemplo : resultados de IL-21 en protección parcial de ratones EAE

Reactivos

Ratones

Ratones hembra C57BL/6 y ratones hembra SJL/J fueron obtenidos de Jackson Laboratory. Los animales fueron encerrados en jaulas dentro de unas instalaciones de barrera aprobadas AAALAC y monitoreadas en cuanto a

166

parásitos lo mismo que en cuanto a bacterias y patógenos virales. Todos los ratones fueron usados entre 8-10 semanas de nacidos.

Respuesta Proliferativa

Las células del nódulo linfático de ratones hembra C57BL/6 fueron retadas con el péptido de glicoproteína de oligodendrocitos de ratón (MOG)₃₅₋₅₅ que fueron cosechadas de ratones de 20 días después de inmunización. Las células fueron cultivadas en un medio de Dulbecco's Modified Eagle's Media (DME) que contenía 10% de suero de cerdo fetal (FCS). Las células fueron restimuladas con el péptido MOG₃₅₋₅₅ (25 µg/ml) y se hicieron crecer en placas microtítulo de fondo plano de 96 pozos en la presencia o ausencia del murina IL-21.

Después de 72 horas, las placas fueron pulsadas con 0.5; µCi de timidina tritiada/ e incubadas durante un periodo de 4-a 6-horas. El significado de la incorporación de timidina en el AND en los pozos triplicados fue medida por un contador de centelleo.

Cuantificación de citocina

Las células de nódulo linfático inmunizadas fueron activadas in vitro con 25 µg/ml del péptido MOG 35 55. Las células fueron cultivadas en (DME) que contenían 10% FCS y IL-2 (10 U/ml) y diversas concentraciones del IL-21 que radiaban entre 5 ng/ml to 25 ng/ml. Los supernadantes del cultivo fueron recolectados luego de 72 horas y analizados en cuanto a citocinas y quimiocinas usando SEARCHLIGHT™ Proteome Array System (Pierce, Boston Technology Center).

167

Inducción y evaluación de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE)

Los ratones hembra SJL/J fueron inmunizados subcutáneamente con 100 µg de la proteína proteolípido (PLP) 39-51 péptido emulsificada en un adyuvante de Freund's suplementado con 800 µg de Mycobacterium tuberculosis H37 Ra (Difco Laboratories). Los ratones también recibieron inyecciones intraperitoneales con 400 µg de toxina pertussis (List Biological Laboratories) en el momento de la inmunización y 48 horas después. Los animales fueron enmarcados o realizados diariamente en cuanto a signos clínicos de EAE de acuerdo con la escala siguiente: 0, ninguna enfermedad; 1, cola flácida; 2, parálisis parcial o debilidad flácida oculta; 3, parálisis flácida oculta completa; 4, parálisis flácida oculta frontal y 5, moribundo. La marcación clínica media fue calculada promediando las calificaciones individuales de los ratones en cada grupo.

Administración del IL-21 in vivo

Los ratones fueron sensibilizados para EAE dándoles inyecciones intraperitoneales de IL-21 de murino en 100 ng/día o 1 µg/día en 0.2 ml de PBS.

Los ratones de control fueron dosificados con 0.2 ml de salina. El Tratamiento se inició el día anterior a la inmunización con el péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁ y continuó en días alternos durante un total de diez dosis.

Respuesta proliferativa y producción de citosina inducida por IL-21 de murina

El efecto del IL-21 en la inducción y expansión de células T específicas al MOG 5-55-específico fueron evaluados. Los resultados indican que el IL-21 indujo la proliferación de linfocitos en una manera dependiente de la dosis. En la Figura 1A

168

y tabla 1, los linfocitos cultivados con 20 ng/ml de IL-21 mostraron un incremento significativo de estrés de3 a 5 veces en la proliferación en comparación con las células estimuladas con el péptido solo. Luego de la titriación de la citocina, las células exhibieron una capacidad proliferativa a las de las células de control.

Tabla 1: Proliferación de Linfocitos en la presencia de IL-21

Dilución	Control	IL-21	ng/ml
	CPM/bgd	CPM/bgd	
1 :50	1.14	3.57	20
1:250	0.95	3. 01	4
1:1250	1.04	2.02	0.8
1:6250	1.49	1.86	0.16
1: 31250	1.13	1.70 0	.032
1: 156250 dil	1.77	1. 45	0.0064

La figura 1B muestra la proliferación incrementada de células T desde la proteína de endoratores transgénicos con la proteína proteolípida (PLP) cultivados como se indicó en la concentración de IL-21 (ng/ml) de múmero en comparación con las células tratadas con solamente 1 g/ml of PLP.

Para identificar sí la respuesta proliferativa de las células T podría ser correlacionada con la producción de citosina, los linfocitos fueron cultivados con el IL-21. El IL-21 indujo una secreción incrementada de la citocina Th2, IL-10, en comparación con las células no tratadas. Esta respuesta fue saturable (Figura 2 y

169

Tabla 2) y en la concentración ensayada de IL-21 (25 ng/ml), las células produjeron aproximadamente 2 a. 5 veces mas de IL-10 que el grupo de control.

Tabla 2: IL-21 Induce la secreción de IL-10

IL-21 (ng/ml)	IL-10 detectado (pg/ml)
0	189.3
5	260. 8
10	457.3
15	466.8
20	486.1
25	515. 0

La Figura 3 muestra una disminución en la secreción del IFN γ por las células del vaso tratadas con concentraciones indicadas del IL-21 de murina, comparados con las células de control. La adición de IL-21 al MOG 33-55 estimuló las células del paso de los ratones inmunizados y resulto en dos veces de disminución del IFN γ , mientras que la adición del IL-21R produjo un incremento de dos veces. Cuando la células del nodo linfático fueron tratadas con IL-21, los niveles de IFN γ fueron disminuidos desde 20,000 pg/ml (control) o 15,840 pg/ml (ficticio tratado) a 3,260 pg/ml (tratado con IL-21).

Los cambios en la secreción de citosina sobre el tratamiento IL-21 o IL-21R son resumidos como sigue en la Tabla 3.

Tabla 3: Cambios en la secreción de citosina

170 

	Tratamiento con IL-21	Tratamiento con IL-21R
Incremento	IL-10	IL-12, IFN γ , TGF β
Disminución	IL-1 α , IL-2, IL-6, IFN γ , IL-18	ninguno
Sin cambio	IL-1 1 β , IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, TNF α , TGF β , MIP-1 α , GM-CSF	IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-18, TNF α , MIP-1 α , GM-CSF

Desarrollo del EAE en ratones tratados con IL-21

Para determinar el papel del IL-21 en el desarrollo del EAE, los ratones fueron inmunizados con el péptido PLP₁₃₉₋₁₅₁ encefalitogénico en CFA más toxina pertusis y tratados ellos con un régimen profiláctico del IL-21. El curso clínico del EAE fue comparado en ratones tratados con salina o IL-21.

La Tabla 4 documenta los cambios promedio en la secreción de citosina en dos cultivos de PLP ilustrativos tratados en la presencia o ausencia de IL-21 de murina. El nivel de citosina en las células de control no tratadas se normalizó a 100.

Tabla 4

Citosina	Control	Tratadas con IL-21
IL2	100	59
IL5	100	73
IL6	100	56

171

IL10	100	250
IFN γ	100	39
TNF α	100	56
GMCSF	100	15

Como se muestra en las figuras 4 y 5, los ratones de control fueron altamente susceptibles a la enfermedad. En contraste los ratones tratados sea con dosis de IL-21 bajas (100ng/día) o altas (1µg/día) tuvieron marcas clínicas menos severas.

La Figura 5 y la Tabla 5 muestran una disminución en la severidad de EAE en ratones tratados sea con dosis bajas (100ng/día) o altas (1µg/día) de IL.21 de murina comparada con los ratones de control

Tabla 5

Día	NaCL	100ng de IL-21	1 µg de IL-21
8	0,7	0,0	0,1
10	2,9	0,0	0,8
12	2,8	1,0	0,8
14	3,3	1,0	1,0
16	3,5	1,2	1,7
18	3,5	1,6	1,9
21	3,5	1,4	1,9
23	3,6	1,3	2,4
25	3,8	1,7	2,1

172

Nuestros hallazgos indican que el IL-21 está involucrado en modular la progresión de EAE y este trayecto por medio de la regulación del IL-10.

Los contenidos de todas las referencias, solicitudes de patentes pendientes y patentes publicadas a lo largo de esta solicitud se incorporan aquí de manera expresa como de referencia.

Equivalentes

Aquellos versados en la técnica podrán reconocer o ser capaces de encontrar usando nomás que la experimentación de rutina, muchas equivalentes de las modalidades específicas de la invención descrita aquí. Tales equivalencias tiene el propósito de estar involucradas o envueltas por las reivindicaciones siguientes.

173

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un método para mejorar un síntoma de esclerosis múltiple en un sujeto, el método comprende:

Administrar al sujeto un agonista de un receptor de interleucina-21 (IL-21)/IL-21 (IL-21R) en una cantidad suficiente para mejorar en síntoma de esclerosis múltiple, en donde dicho agonista es seleccionado del grupo que consiste de un polipéptido de IL-21, un anticuerpo anti-IL-21 R agonístico y un fragmento que liga antígeno de un anticuerpo anti-IL-21R agonístico.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el agonista es un polipéptido de IL-21 que comprende una secuencia de por lo menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácido del ID de Sec. No.: 2 y es capaz de ligar a un IL-21R.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el agonista es un polipéptido de IL-21 que comprende una secuencia de por lo menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácido del ID de Sec. No.: 2 y es capaz de ligar a un IL-21R.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el agonista es un polipéptido de IL-21 que comprende una la secuencia de aminoácido del ID de Sec. No.: 2.

174

5. El método de la reivindicación 1, en donde el agonista es un anticuerpo anti-IL-21R agonístico o un fragmento que liga al antígeno del mismo.
6. El método de la reivindicación 5, en donde el anticuerpo anti-IL-21R agonístico es un anticuerpo humano.
7. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente administrar al sujeto por lo menos un agente antiinflamatorio.
8. El método de la reivindicación 7, en donde el agente antiinflamatorio es seleccionado dentro del grupo que consiste de IFN β -1 α , IFN β -1 β , agonista de TNF, agonista de IL-12, agonista de IL-23, metotrexato, leflunomida, sirolimus (rapamicina), y CCI-779.
9. El método de la reivindicación 1, en donde el sujeto es un mamífero.
10. El método de la reivindicación 1, en donde el agonista de IL-21/IL-21R es administrado en la forma de una dosis única.
11. El método de la reivindicación 1, en donde el agonista de IL-21/IL-21R es administrado en una serie de dosis separadas por intervalo de días, semanas o meses.
12. El método de la reivindicación 1, en donde el agonista de IL-21/IL-21R es administrado por inyección.

175

16

- 13.El método de la reivindicación 12, en donde el agonista de IL-21/IL-21R es inyectado dentro del sistema nervioso central.
- 14.El método de la reivindicación 12, en donde el agonista de IL-21/IL-21R es inyectado intratéticamente o intravenosamente.
- 15.El método de la reivindicación 12, en donde el agonista de IL-21/IL-21R es inyectado en el fluido cerebroespinal lumbar.
- 16.El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente evaluar un sujeto en cuanto el riesgo de esclerosis múltiple por medio de evaluar un parámetro de IL-10 del sujeto.
- 17.El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente, antes de administrar, evaluar un parámetro de IL-10 del sujeto.
- 18.El método de la reivindicación 17, que comprende adicionalmente, después de administrar, evaluar un parámetro de IL-10 del sujeto en donde un incremento del parámetro de IL-10 indica un efecto terapéutico.
- 19.El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente, después de administrar, evaluar un parámetro de IL-10 del sujeto.
- 20.Una composición farmacéutica que comprende un agonista del IL-21/IL-21R y un agente antiinflamatorio, en donde dicho agonista IL-21/IL-21R se selecciona del grupo que consiste de un polipéptido IL-21, un

126

anticuerpo anti-IL-21R agonístico y un fragmento que liga antígeno de un anticuerpo anti-IL21R agonístico.

21..La composición farmacéutica de la reivindicación 20, en donde el agonista es un polipéptido de IL-21 tiene una secuencia de por lo menos 90% idéntica a la secuencia de aminoácido del ID de Sec. No.:2 y es capaz de ligar a un IL-21R.

22.La composición farmacéutica de la reivindicación 20, en donde el agonista es un polipéptido de IL-21 que tiene una secuencia de por lo menos 95% idéntica a la secuencia de aminoácido del ID de Sec. No.:2 y es capaz de ligar a un IL-21R.

23.La composición farmacéutica de la reivindicación 20, en donde dicho agonista de IL-21/IL-21R comprende la secuencia de aminoácido del ID de Sec. No.:2 y es capaz de ligar a un IL-21R.

24.La composición farmacéutica de la reivindicación 20, en donde el agente anti inflamatorio. es seleccionado del grupo que consiste de IFN β -1 α , IFN β -1 β , agonista de TNF, agonista de IL-12, agonista de IL-23, metotrexato, leflunomida, sirolimus (rapamicina), y CCI-779.

25.La composición farmacéutica de la reivindicación 20, en donde el agonista es un anticuerpo anti-IL-21R agonístico o un fragmento que liga al antígeno del mismo.

127

26. La composición farmacéutica de la reivindicación 25, en donde el anticuerpo anti-IL-21R agonístico es un anticuerpo humano.

27. Una composición farmacéutica que comprende un agonista IL-21/IL-21R y una proteína que estimula la proteína básica de la mielina, en donde dicho agonista IL-21/IL-21R se selecciona del grupo que consiste de un polipéptido IL-21, un anticuerpo anti-IL-21R agonístico y un fragmento que liga al antígeno de un anticuerpo anti-IL21R agonístico.

28. La composición farmacéutica de la reivindicación 27 en donde el agonista IL-21/IL-21R es una proteína que comprende un polipéptido IL-21, y la proteína que estimula la proteína básica de la mielina comprende acetato de glatirámico.

29. Un método para mejorar un síntoma de esclerosis múltiple en un sujeto mamífero, el método comprende:

Administrar al sujeto un polipéptido de interleucina-21 (IL-21)/IL-21 (IL-21R) en una cantidad suficiente para mejorar la esclerosis múltiple o por lo menos un síntoma de esclerosis múltiple en el sujeto.

30. El método de la reivindicación 29, en donde el es humano, y el polipéptido de IL-21 es un polipéptido de IL-21 humano.

31. El método de la reivindicación 30, en donde el polipéptido de IL-21 la ID de Sec. No.: 2.

178

32.El método de la reivindicación 30, en donde el polipéptido de IL-21 es producido recombinantemente.

33.El método de la reivindicación 30, en donde el polipéptido de IL-21 es producido recombinantemente en una célula bacterial.

34.Un método para modular una deficiencia de IL-10, o un desorden asociado con una deficiencia de IL-10 en un sujeto mamífero, el método comprende:

Administrar al sujeto un polipéptido de interleucina-21 (IL-21)/IL-21 (IL-21R) en una cantidad para incrementar la expresión de IL-10 o su actividad en el sujeto.

35.El método para tratar o prevenir un desorden inmunológico en un sujeto mamífero, el método comprende:

Evaluar un parámetro de IL-10 en un sujeto mamífero; y

Administrar, al sujeto, un polipéptido de interleucina-21 (IL-21)/IL-21 (IL-21R) en una cantidad que es dependiente de los resultados del parámetro IL-10 evaluado.

36.El método de la reivindicación 35, en donde el parámetro IL-10 comprende información cuantitativa acerca de los niveles de la proteína IL-10 o del mRNA de IL-10.

179

37.El método de la reivindicación 35, en donde el parámetro de IL-10 comprende información cuantitativa acerca de los niveles de la actividad de la proteína IL-10.

38.El método de la reivindicación 35, en donde el desorden inmunológico es un desorden neurológico.

39.El método de la reivindicación 38, en donde el sujeto es humano y el desorden inmunológico esclerosis múltiple.

40.El método de la reivindicación 38, en donde el desorden inmunológico causa daño o alteración a las cubiertas de la mielina.

41.Un método para evaluar el tratamiento de la esclerosis múltiple en un sujeto mamífero, el método comprende:

Administrar, al sujeto, un agonista de una interleucina-21 (IL-21)/IL-21 receptor de IL-21 (IL-21R); y

Evaluar un parámetro de IL-10 en el sujeto.

42.El método de la reivindicación 41 que comprende adicionalmente administrar al sujeto una segunda dosis del agonista, en donde la segunda dosis es administrada como una función del parámetro de IL-10 evaluado.

140

T70

43.El método de la reivindicación 41 en donde el agonista es seleccionado del grupo que consiste de un polipéptido IL-21, un anticuerpo anti-IL-21R agonístico y un fragmento que liga a antígeno de un anticuerpo anti-IL21R agonístico

44..El método de la reivindicación 43 en donde el agonista es un polipéptido de IL-21.

45.El método de la reivindicación 44 en donde el sujeto es humano y el polipéptido de IL-21 es un polipéptido de IL-21 humano.

46..El método de la reivindicación 44 en donde el polipéptido de IL-21 comprende la ID de Sec. No.: 2.

47.Un artículo de manufactura que comprende

- (i) un recipiente con una o mas dosis de unidades de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de IL-21; y
- (ii) instrucciones para administrar las dosis unitarias a un sujeto que tiene o se sospecha que tiene esclerosis múltiple.

48.El artículo de la reivindicación 47 en donde las instrucciones son suministradas sobre una etiqueta.

49.El artículo de la reivindicación 48 en donde la etiqueta se fija a una superficie externa del recipiente.

181

**TRATAR DESORDEN INMUNOLÓGICO USANDO AGONISTAS DE
INTERLEUCINA – 21/RECEPTOR DE INTERLEUCINA – 21**

RESUMEN:

Métodos y composiciones para modular la actividad (MU-1) de la interleucina-21 (IL-21)/ receptor de IL-21 usando agonistas IL-21 o receptor IL-21 ("IL-21R" o "MU-1"), se describen. Los agonistas IL-21/ IL-21R pueden ser usados por ellos mismos o en combinación con cinco agentes anti inflamatorios para tratar, por ejemplo, mejorar, síntomas asociados con desordenes inmunológicos del sistema nervioso, por ejemplo esclerosis múltiple.

COLO 13665-841-002-4
PRP/WPC13665/ID-000032

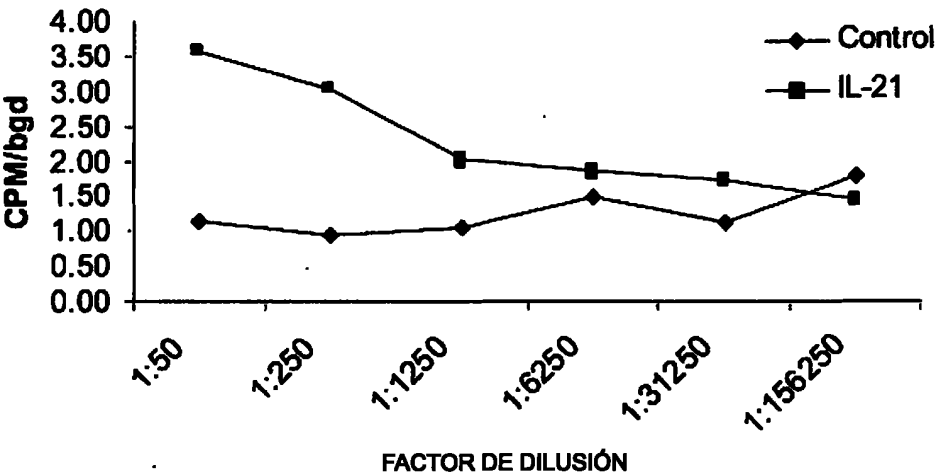


FIG. 1A

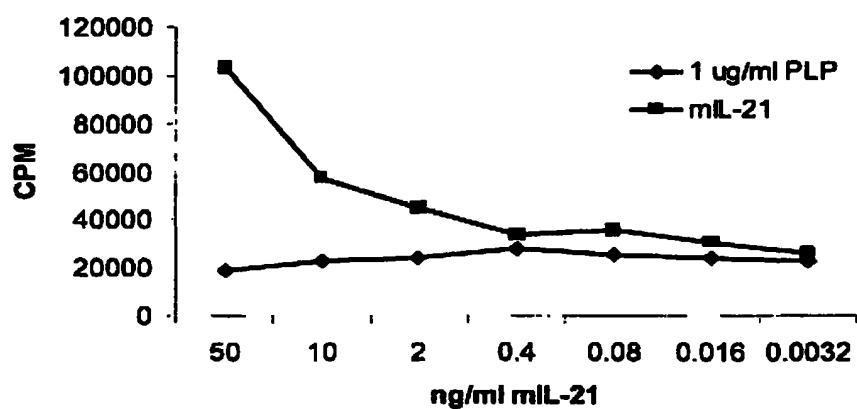


FIG. 1B

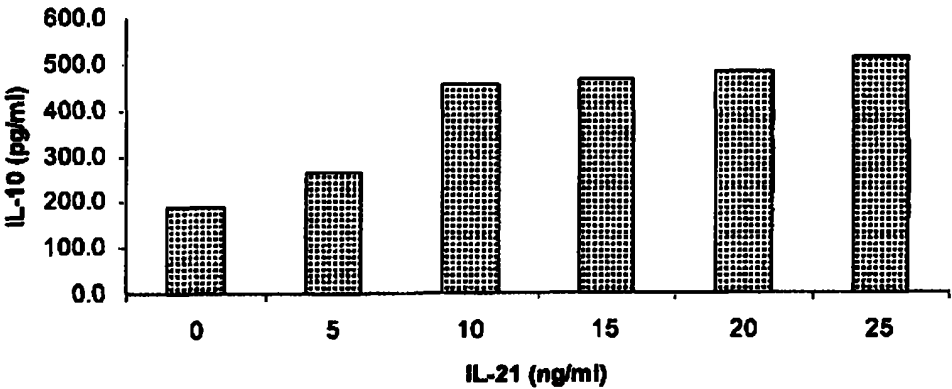


FIG. 2

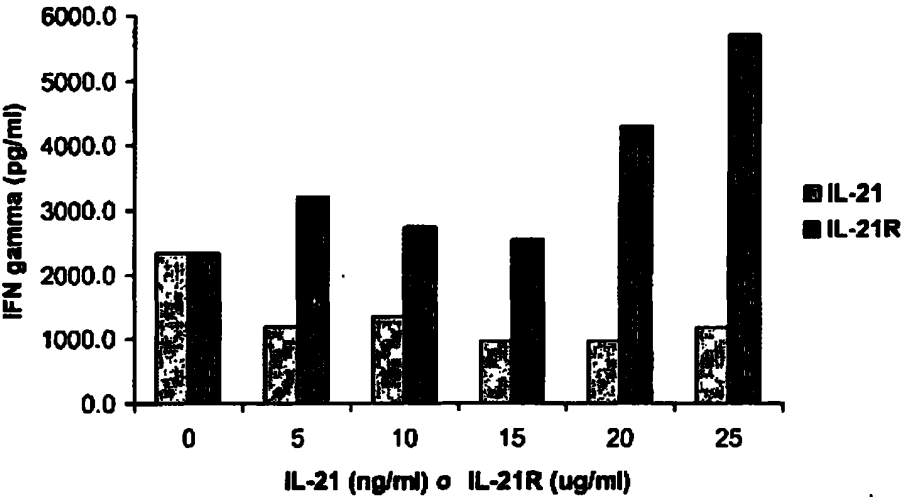


FIG. 3

Handwritten signature

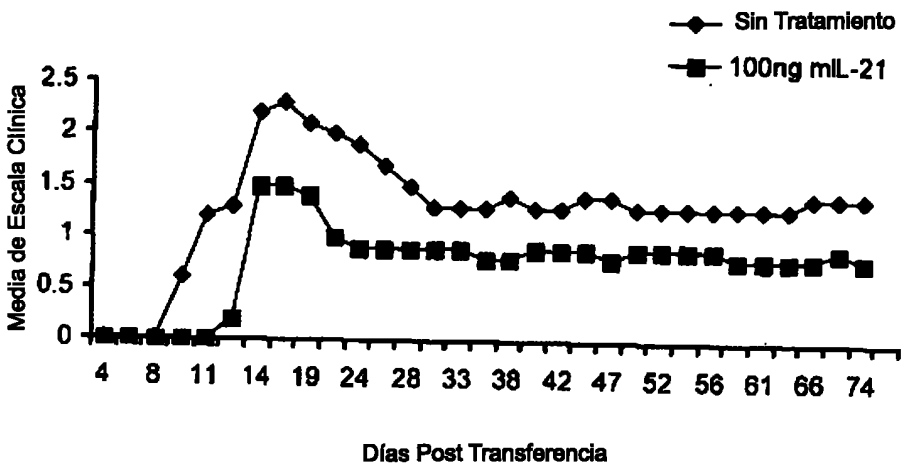


FIG. 4

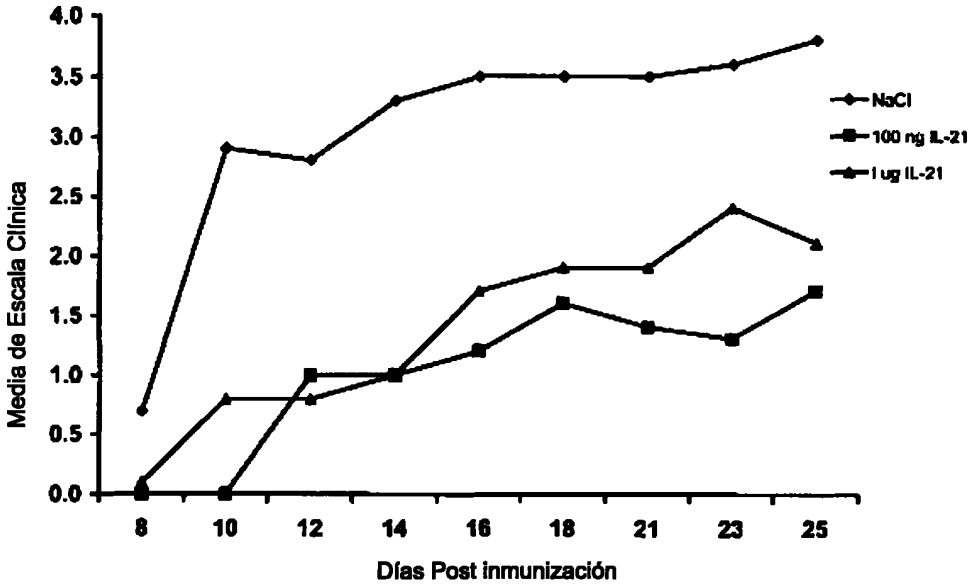


FIG. 5

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum)

16158-013WO1

Box No. I TITLE OF INVENTION TREATING IMMUNOLOGICAL DISORDERS USING AGONISTS OF INTERLEUKIN-21/ INTERLEUKIN-21 RECEPTOR	
Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) WYETH 5 Giralda Farms Madison, New Jersey 07940 United States of America	Telephone No. Facsimile No. Teleprinter No. Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) COLLINS, Mary 54 Rathburn Road Natick, Massachusetts 01760 United States of America	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	
Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☐ agent ☐ common representative	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) MYERS, Louis Fish & Richardson P.C. 225 Franklin Street Boston, Massachusetts 02110-2804 United States of America	Telephone No. (617) 542-5070 Facsimile No. (617) 542-8906 Teleprinter No. Applicant's registration No. with the Office 35,965
☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.) CHIN, Elaine Y. 2 Peabody Court Concord, Massachusetts 01742 United States of America	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.) SENICES, Mayra 5 Holden Avenue Saugus, Massachusetts 01906 United States of America	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.) YOUNG, Deborah A. 39 Nelson Road Melrose, Massachusetts 02176 United States of America	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: US	State (that is, country) of residence: US
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence (if no State of residence is indicated below.)	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.	

See Notes on the request form

Box No. VIII (ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VII, VIII (i) to (iv) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51 bis 1(a)(ii), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

in relation to this international application,

WYETH, is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

an assignment from COLLINS, Mary, CHIN, Elaine Y., SENICES, Mayra, and YOUNG, Deborah A. to WYETH, dated 12 January 2004, 22 January 2004, 12 January 2004, and 12 January 2004 respectively.

This declaration is made for the purposes of all designations, except the designation of the United States of America.

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (ii)".

Box No. VIII (B) DECLARATION: ENTITLEMENT TO CLAIM PRIORITY

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 213; see Notes to Boxes Nos. VII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (B). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)):

in relation to this international application,

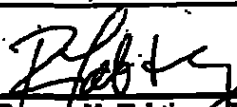
WYETH, is entitled to claim priority of earlier application
No. 60/456,920

by virtue of the following:

an assignment from COLLINS, Mary, CHIN, Elaine Y., SENICES, Mayra, and YOUNG, Deborah A. to WYETH,
dated 12 January 2004, 22 January 2004, 12 January 2004, and 12 January 2004 respectively.

This declaration is made for the purposes of all designations, except the designation of the United States of America.

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (B)".

Box No. IX CHECK LIST: LANGUAGE OF FILING						
This international application contains: (a) In paper form, the following number of sheets: request (including declaration sheets) : 6 description (excluding sequence listings and/or tables related thereto) : 54 claims : 6 abstract : 1 drawings : 6 Sub-total number of sheets : 73 sequence listings : 15 tables related thereto : (for both, actual number of sheets if filed in paper form whether or not also filed in computer readable form; see (c) below) Total number of sheets : 88 (b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i)) (i) ☐ sequence listings (ii) ☐ tables related thereto (c) ☒ also in computer readable form (Section 801(a)(ii)) (i) ☒ sequence listings (ii) ☐ tables related thereto Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the: ☒ sequence listings: _____ ☐ tables related thereto: _____ (additional copies to be indicated under items 9(i) and/or 10(ii), in right column)	This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item): 1. ☒ fee calculation sheet : 1 2. ☐ original separate power of attorney : 3. ☐ original general power of attorney : 4. ☐ copy of general power of attorney, reference number, if any: _____ : 5. ☐ statement explaining lack of signature : 6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s) _____ : 7. ☐ translation of international application into (language): _____ : 8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material : 9. ☒ sequence listings in computer readable form (indicate type and number of carriers) : (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application): : (ii) ☐ (only where check box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter : (iii) ☒ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listings mentioned in left column : 10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listings (indicate type and number of carriers) : (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application) : (ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802 (b-quater) : (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column : 11. ☒ other (specify) check; postcard : 2	Number of items				
Figure of the drawings which should accompany the abstract: 5	Language of filing of the international application: English					
Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE <i>Please to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request)</i>  Ramon K. Tabtiang, Reg. No. 55,658						
For receiving Office only <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 70%; padding: 2px;"> 1. Date of actual receipt of the purported international application: _____ 3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application: _____ 4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2): _____ 5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / _____ </td> <td style="width: 30%; padding: 2px;"> 2. Drawings: ☐ received: ☐ not received: </td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="padding: 2px;"> 6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid </td> </tr> </table>			1. Date of actual receipt of the purported international application: _____ 3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application: _____ 4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2): _____ 5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / _____	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	
1. Date of actual receipt of the purported international application: _____ 3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application: _____ 4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2): _____ 5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / _____	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:					
6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid						
For International Bureau use only Date of receipt of the record copy by the International Bureau: _____						

PATENT COOPERATION TREATY

194

From the RECEIVING OFFICE

PCT

INVITATION TO CORRECT DEFECTS IN THE INTERNATIONAL APPLICATION

(PCT Articles 3(4)(i) and 14(1) and Rule 26)

To: LOUIS MYERS FISH & RICHARDSON P.C. 225 FANKLIN STREET BOSTON, MASSACHUSETTS 02110-2804	Date of mailing <i>(day/month/year)</i> 26 May 2004
Applicant's or agent's file-reference 16158-013WO1	REPLY DUE within <u>1</u> months/days from the above date of mailing
International application No. PCT/US2004/008833	International filing date <i>(day/month/year)</i> 22 Mar 2004
Applicant WYETH	

1. ☒ The applicant is hereby invited, within the time limit indicated above, to correct, in the international application as filed, the defects specified on the attached:
- ☒ Annex A
 - ☐ Annex B1 (text matter of the international application as filed)
 - ☐ Annex C1 (drawings of the international application as filed)

2. ☐ The applicant is hereby invited, within the time limit indicated above, to correct, in the translation of the international application furnished under Rule 12.3 or 12.4, the defects specified on the attached:
- ☐ Annex A
 - ☐ Annex B2 (text matter of the translation of the international application)
 - ☐ Annex C2 (drawings of the translation of the international application)

Additional observations (if necessary):

HOW TO CORRECT THE DEFECTS?

Correction must be submitted by filing a replacement sheet embodying the correction and a letter accompanying the replacement sheet, which shall draw attention to the difference between the replaced sheet and the replacement sheet. A correction may be stated in a letter only if it is of such a nature that it can be transferred from the letter to the record copy without adversely affecting the clarity and direct reproducibility of the sheet onto which the correction is to be transferred (Rule 26.4).

ATTENTION

Failure to correct the defects will result in the international application being considered withdrawn by this receiving Office (see Rule 26.5 for further details).

A copy of this invitation and any attachments has been sent to the International Bureau

☒ and the International Searching Authority

Name and mailing address of the receiving Office Mail Stop PCT, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 703-305-3230	Authorized officer Marilyn Younger Telephone No. 703-305-3753
--	--

Form PCT/RO/106 (January 2004)

Docketed By Billing Secretary
Due Date:
Deadline:
Initials:

Docketed By Practice Systems
Action Code: <u>Invite to Law</u>
Base Date: <u>5-26-04</u>
Due Date: <u>6-26-04</u>
Deadline:
Initial: <u>nm</u>

The receiving Office has found the following defects in the international application as filed:

1. As to signature of the international application (Rules 4.15, 26.2bis(a) and 90.4), the request:

- a. ☐ is not signed* by the applicant or, if there is more than one applicant, by at least one of them
- b. ☐ is not accompanied by the statement referred to in the check list in Box No. IX of the request explaining the lack of the signature of an applicant for the designation of the United States of America
- c. ☒ is signed by what appears to be an agent/common representative but:
- ☒ the international application is not accompanied by a power of attorney appointing him
- ☐ the power of attorney accompanying the international application is not signed by all the applicants
- d. ☐ other (specify):

- * Although Rule 4.15 requires that all applicants must sign the request (e.g. including all inventors/applicants for the designation of the United States of America), for the purposes of Article 14(1)(a)(i), if there is more than one applicant, it shall be sufficient that the request be signed by one of them (Rule 26.2bis(a)).

However, the applicant's attention is drawn to the fact that the national law applied by each designated Office may require, in connection with the processing of the international application in the national phase, that the applicant furnish the confirmation of the international application by the signature of any applicant for the designated State who has not signed the request (Rule 51bis.1(a)(vi)).

2. As to indications concerning the applicant* who is entitled, according to Rule 19.1, to file the international application with the receiving Office, the request (Rules 4.4, 4.5 and 26.2bis(b)):

- a. ☐ does not properly indicate the applicant's name (specify):
- b. ☐ does not indicate the applicant's address
- c. ☐ does not properly indicate the applicant's address (specify):
- d. ☐ does not indicate the applicant's nationality
- e. ☐ does not indicate the applicant's residence

- ☐ Further observations about indications concerning other applicants (if applicable):

- * Although Rules 4.4 and 4.5 require indications concerning the applicant, or if there are several applicants, of each of them, for the purposes of Article 14(1)(a)(ii), if there is more than one applicant, it shall be sufficient that the indications required under Rule 4.5(a)(ii) and (iii) be provided in respect of one of them who is entitled according to Rule 19.1 to file the international application with the receiving Office (Rule 26.2bis(b)).

However, the applicant's attention is drawn to the fact that the national law applied by each designated Office may require, in connection with the processing of the international application in the national phase, that the applicant furnish any missing indication required under Rule 4.5(a)(ii) and (iii) in respect of any applicant for the designated State (Rule 51bis.1(a)(vii)).

3. As to the language of certain elements of the international application, other than the description and claims (Rules 12.1(c) and 26.3ter(a) and (c)):

- a. ☐ the request is not in a language of publication accepted by this receiving Office; (the) language(s) accepted by this receiving Office is/are:
- b. ☐ the text matter of the drawings is not in the language in which the international application is to be published, which is:
- c. ☐ the abstract is not in the language in which the international application is to be published, which is:

4. The title of the invention:

- a. ☐ is not indicated in Box No. I of the request (Rule 4.1(a))
- b. ☐ is not indicated at the top of the first sheet of the description (Rule 5.1(a))
- c. ☐ as appearing in Box No. I of the request is not identical with the title heading the description (Rule 5.1(a))

5. As to the abstract (Rules 8 and 26.1(b)):

- ☐ the international application does not contain an abstract

PCT COOPERATION TREATY

WO 2004/084835
PCT/US2004/008833

NLS
PCM
RKT

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF
THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH
DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT
UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

MYERS, Louis
Fish & Richardson P.C.
225 Franklin Street
Boston, MA 02110-2804
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

196

Date of mailing (day/month/year)

21 October 2004 (21.10.2004)

RECEIVED

Applicant's or agent's file reference

16158-013WO1

NOV 03 2004

IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/US2004/008833

Designated Office (day/month/year)

BOSTON OFFICE
22 March 2004 (22.03.2004)

Priority date (day/month/year)

21 March 2003 (21.03.2003)

Applicant

WYETH et al

ATTENTION: For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), does apply, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).

2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does not apply, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
07 October 2004 (07.10.2004)

CH

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), 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).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does not apply, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

FI, LU, SE, TZ, UG, ZM

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 20 MONTHS from the priority date.

In practice, time limits other than the 20-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For regular updates on the applicable time limits (20 or 21 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>.

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

Reviewed By Practice Systems

Initials: WLC

Reviewed By Billing Secretary

Initials: _____

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

Authorized officer

Yolaine Cussac

Facsimile No.+41 22 740 14 35

Facsimile No.+41 22 338 70 80

01997.043200.PC

PCT INTERNATIONAL APPLICATION

28
197

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE

In re Application of:)
: Authorized Officer: Yolaine Cussac
WYETH)
:
International Application No.:)
:
PCT/US2004/008833)
:
Filed: 22 March 2004)
:
Priority Date: 21 March 2003)
:
For: TREATING IMMUNOLOGICAL)
DISORDERS USING AGONISTS)
OF INTERLEUKIN-21/)
INTERLEUKIN-21 RECEPTOR)
11 August 2005

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

REQUEST FOR CHANGE UNDER RULE 92.bis.1

Sir or Madam:

Pursuant to PCT Rule 92bis.1 and Section 422 of the PCT Administrative

Instructions, we would like to advise you that legal representation has changed for the
above-identified International Application. Please make this change as follows:

Previous Agent: Myers, Louis
Fish & Richardson P.C.
225 Franklin Street
Boston, Massachusetts 02110-2804
US

78
198

Current Agent: Mandra, Raymond R.
Fitzpatrick, Cella, Harper & Scinto
30 Rockefeller Plaza
New York, NY 10112-3801
US

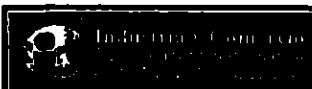
The undersigned agent may be reached at our New York office by telephone
at (212) 218-2100. All correspondence should be directed to our address listed below.

Respectfully Submitted,


Attorney for Applicant
Raymond R. Mandra
Registration No. 34,382

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
Facsimile: (212) 218-2200

NY_MAIN 517122v1



FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS



Royal
Technologies S.A.
Ingeniería de Software y Servicios

199

Expediente No		05095725	No de Folia
Item		No de unidades	
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA		
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA	x 7	✓
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones:

contiene Arte final

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

200
191

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 69,906
FECHA : SEPTIEMBRE 12 DE 2005

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 13665-84102-4
Fecha (UNO) : 2005-09-21 17:10:34
Folios: 191
Frente : 011 PCI-PATENT S/D FASE NRCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2820 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	31556010	12/09/2005	40,239,000.

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRANITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Cdo 13665-84102-4

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCIÓN	()	()
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:

202



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Folio 193

2020
Bogotá DC

Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado(a) y/o Representante
WYETH

REFERENCIA:	Radicación No.	05 95726
	Solicitud Internacional	PCT/US2004/008833
	Fecha límite inicio fase Nacional	21 - 10 - 2005
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	1451
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cumplase
Dado en Bogotá DC

22 NOV. 2005

ALIX CESPEDÉS DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Al contestar favor indique el número de radicación consignado en el sticker

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Commutador: 3 820840 Fax: 3 505220
Sede CAN: Tr. 40A No. 38-50 3153265 al 69
Fax: 3 505220. Línea 9800-910 165
Web: www.sic.gov.co e-mail: jefe@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia